



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Desarrollo de Tecnologías Proteómicas
de Última Generación Aplicadas al
Estudio del Remodelado Vascular**

TESIS DOCTORAL

Fernando José García Marqués

Madrid, 2017

A mi abuelo José

“La ciencia sin religión está coja y la religión sin ciencia está ciega”.

Albert Einstein, Nueva York 1940

AGRADECIMIENTOS

Con estas palabras comienza el final de una etapa educativa más de mi vida, y es por eso que me gustaría recordar a todos aquellos de los que, a lo largo de 29 años, he aprendido algo; y todos aquellos con los que he compartido mis experiencias formativas. Son muchos los profesores que he tenido a lo largo de mi vida, desde Milagros en la guardería; Pepa, Maribel, Guadalupe, Cristina (decías que no iba a llegar ni a secundaria y mira) Jesús (el "Macarrón")... Algunos amables, algunos incluso cariñosos; pero sobre todo los que han dejado huella en mí son los duros. Fueron los profesores que tuve en Secundaria los que me enseñaron lo que era la ciencia: Cati, Matilde y Jesús. Ellos fueron de los que oí por primera vez las palabras Biología Celular y Biotecnología. Posteriormente, de la carrera me acuerdo muchísimo de Dr. Pepe Arencibia y, cómo no, querría darle las gracias a Jesús Vázquez, que me introdujo en el mundo de la Proteómica. Él confió en mí cuando aún estaba en la universidad y hemos pasado ya 6 años viendo que *"algo estaba mal"*... Cada día en tu laboratorio es una suerte para mí.

A mis compañeros con los que he compartido todos estos años: muchas gracias por acompañarme en parte del camino, primero en el colegio Santa Teresa de Moraleja de Enmedio, posteriormente, en Móstoles en el instituto Antonio Gala. Uno de los gestos más bonitos que han tenido conmigo fue el primer día allí, cuando Ángel me dijo: "tú eres nuevo no? Siéntate aquí conmigo". Eternamente agradecido, macho. Y finalmente en la Francisco de Vitoria. Tengo muy buenos recuerdos de muchos, aunque como no me gusta salir y soy bastante dejado para mantener el contacto, sólo os sigo a algunos por Facebook.

Durante la formación de una persona son muy importantes los maestros de fuera de casa, pero si he tenido una suerte en mi vida es la de ir aprendiendo de todos aquellos de los que me rodeaban. Por diferentes circunstancias he tenido la suerte de criarme al lado de mis abuelos, de lo cual no podría estar más agradecido. Algunas veces me iba a recoger mi bisabuelo Blás a la guardería, pero con el qué más tiempo pasé fue con mi abuelo José. No hay ni un solo día que no me acuerde de ti. Y acordarme de ti es acordarme inmediatamente de la abuela Ascensión. No hay mejor persona y más entregada a los demás que tú. Un auténtico ejemplo en todo. Junto a la abuela Salustiana y la abuela Juliana formasteis un auténtico consejo de sabios para mí. Ojalá pudiera haber disfrutado incluso más esos momentos. Mi tía Asun también formó parte importante de mi educación cuando nos daba de cenar y nos traía a mi hermana y mí a Móstoles por Arroyo en el AX blanco. Porque mi Madre, la persona de la que aprendí que lo más importante en la vida es ser buena persona y querer a mis hermanos, estaba trabajando. Ese valor también lo aprendí de ti. Hay que trabajar, esforzarse y darlo todo para sacar adelante aquellos que te importan.

Mi etapa profesional empezó en 2010 cuando entré por primera vez en el laboratorio de Proteómica de Jesús Vázquez en el CBMSO y me pusieron bajo la supervisión de Elena. Ella me enseñó absolutamente todo del mundo de la proteómica de manera

profundamente rigurosa con sus buenos protocolos y, sobre todo, me introdujo en el maravilloso mundo de la Biología de Sistemas. Muchas gracias Elena. Allí conocí a otras muchas personas importantes durante el desarrollo de mi tesis y con las que he compartido buenos momentos, discusiones de fútbol, workflows de análisis y muchísimas comidas: Dani, Pablo e Inma. Mención aparte quiero hacer para Raquel y Estefanía que me cuidaban muchísimo durante todos estos años, me dejaban su tarjeta personal para poder comer e incluso han peleado para que pudiera comer del menú del CNIC aun siendo externo. Y a Marco, el tipo más peculiar que conozco y del que no me canso día a día de aprender cosas nuevas de cualquier tema que uno se pueda imaginar. Juntos conseguimos colocar el triángulo.

Unos años más tarde nos mudamos al CNIC dónde tuve en una primera etapa dos compañeras de sitio: primero Pili, que llevábamos juntos desde la Uni, y que me robaba la comida; y después Marta con la que he compartido además uno de los mejores viajes que he hecho en mi vida. En el CNIC también conocí a la antigua unidad (una y trina) de Proteómica del CNIC: JAL, Emilio y Enrique. Y más tarde a Mariano que siempre tenía algún dicho de su tierra y con el que protagonizamos algún que otro “pique” futbolístico. Con Emilio sufrí bastante los viejos tiempos del QuiXtoQuiX, el Rawtobinstack y el BEA, pero sin duda lo que más agradezco son los momentos que perdía para explicarnos las cosas tranquilamente. A JAL le tengo que agradecer sus buenos consejos y algunas de las expresiones que más han calado en mí durante mi estancia en el laboratorio. Tiparracos carroñeros. Y el más tiparraco es sin duda Enrique. Juntos hemos trabajado en muchos y muy variados temas y he aprendido muchísimo de proteómica con él. Lo más importante que puedo decir: a mí en ningún momento me has fallado.

La última etapa de escritura y finalización no se entendería de ninguna manera sin su llegada al labo y la progresiva formación del parvulario: Alex, Celia, Ricardo, Diego, Rocío y Jesús, y aunque no sea estrictamente del parvulario, Alessia y también Ileana. Las merienditas, los temas de conversación interminables, algunos absurdos y otros no tanto, los sapiens siempre serán más listos que los neandertales, los problemas del Madrid, los programas que empezamos, los millones de análisis de Martín Ventura, cálculos de FDR, los comités organizadores, las caretas, la Yoli, el Fridays, las compras navideñas, los paper bomba... me lo habéis hecho pasar muy muy bien. Tampoco me quiero olvidar del resto de bioinformáticos carroñeros: Iakes, Navratan y Spiros, con los que quizás he compartido menos tiempo por unos motivos u otros pero al final hemos sufrido juntos en la cueva.

También quiero agradecer a toda la manada que me escucha cuando me da por hacer monólogos sobre temas científicos. Gracias por vuestras preguntas. Como en mi tesis no voy a mentir y voy a ser todo lo riguroso que pueda os tengo que decir que a veces me invento cosas y vosotros no os dais cuenta. Muchas de las cosas que hacemos juntos ya son tradición y quiero seguir compartiendo planes con vosotros. También quiero agradecer

el tiempo que pasamos juntos, las cenas en el chino rosa, las pizzas del Dóminos, el tiempo que hemos sido vecinos, las discusiones sobre Florentino, las celebraciones de cumpleaños... a Adri, María, Antonio, Maurine, Coto, Anabel y Dani Ramos.

Aunque ya he mencionado a la cabeza (mi madre), finalmente quiero decir que mi familia es muy muy muy importante para mí (aunque es peculiar). Mi hermana Soraya, mi antítesis en cuanto a fiestas, salidas nocturnas y demás, pero con un corazón enorme. Una tía súper trabajadora, que quiere retomar los estudios. Nunca es tarde si la dicha es buena. Y mi hermano Marcos, el tipo más grande que ha parido mi madre. "Te quiero muchísimo, eres mi mejor hermano". Javi, del que aprendí que ser del Madrid es la mayor gloria que se puede alcanzar en vida. Y mi padre... nunca la genética puede estar más a favor de alguien. Somos como dos gotas de agua. "Si pones un cordel de lado a lado de la habitación no pasan las moscas". Y de repente se me quitó el miedo. Voy a hacer todo lo que esté en mi mano para recuperar el tiempo perdido.

Es imposible cerrar los agradecimientos sin mencionar a mi compañera de vida, Karen, con la que he vivido todos los momentos buenos desde que tenía 16 años. El auténtico hilo conductor de mi vida. Contigo he crecido no solo en edad si no como persona en todos los sentidos. Así lo atestigua Madrid, Nueva York, Londres, Singapur, Chicago, Los Ángeles, incluso Las Vegas, las llanuras del Masai Mara o un pequeño orfanato a las afueras de Nairobi, donde dejamos parte de nuestro corazón y encontramos alegría. "Joy", porque está siempre sonriendo. Gracias por aguantar todas mis "pestosidades", gracias por compartir tu vida conmigo, gracias por los viajes, por tu simpatía, por los planes, por tu entusiasmo, por lo buena que eres con los demás, pero sobre todo gracias por el perrito y por los años que están por venir.

Al Real Madrid C.F.

Muchas gracias a todos, Fer o Nando.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
GLOSARIO DE TÉRMINOS	9
INTRODUCCIÓN	13
1. Sistema cardiovascular	15
1.1. Estructura de la pared vascular.....	15
2. Remodelado vascular.....	17
2.1. Papel de las VSMC en el remodelado vascular.....	17
2.2. Papel de la AngII en el remodelado vascular	18
2.3. Papel de RCAN1 en el remodelado vascular	20
3. Proteómica basada en espectrometría de masas.....	21
3.1. Proteómica cuantitativa	23
3.1.1. Cuantificación relativa	24
3.1.1.1. Métodos de marcaje isotópico estable.....	24
Marcaje metabólico.....	24
Marcaje químico	25
Marcaje enzimático	27
3.1.2. Métodos <i>label-free</i>	27
3.1.2.1. Señal de intensidad de los péptidos.....	27
3.1.2.2. <i>Spectral counting</i>	28
3.1.3. Cuantificación absoluta.....	28
3.1.3.1. Métodos de marcaje isotópico estable.....	28
3.1.3.2. Métodos <i>label-free</i>	29
4. De moléculas a redes.....	30
4.1. Comportamiento del proteoma	32
4.2. Proteómica de interacción	34
5. Estado actual y tendencias en proteómica de VSMC.....	35

OBJETIVOS.....	37
-----------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS	41
-----------------------------------	-----------

1. Preparación de las muestras	43
1.1. Aislamiento, cultivo, activación de VSMC y extracción de proteínas	43
1.2. Procesamiento de tejidos cerebral y vascular, activación de VSMC en explantes de segmentos de aorta y extracción de proteína.....	44
1.3. Diseño de los experimentos de interactómica de RCAN1	45
1.4. Digestión del proteoma completo en gel concentrante, marcaje isotópico de péptidos mediante iTRAQ 8plex y fraccionamiento de péptidos por intercambio catiónico	46
2. Análisis mediante LC-MS/MS e identificación de péptidos.....	48
2.1. Método de adquisición dependiente de datos (DdS o DDA)	48
2.2. Método de adquisición independiente de datos (DiS o DIA)	49
2.3. Identificación de péptidos a partir de datos procedentes de DdS y DiS.....	50
3. Proteómica cuantitativa y análisis estadístico	51
3.1. Cuantificación absoluta de proteínas basada en intensidad	53
3.1.1. Cálculo del número de copias por célula.....	53
4. Análisis mediante biología de sistemas.....	53
4.1. El Triángulo de Biología de Sistemas (SBT)	53
4.2. Estimación de la coordinación del proteoma	55
4.3. Simplificación de las categoría con información redundante.....	55
5. Cuantificación peptídica <i>label-free</i> y aplicación del modelo estadístico WSPP a datos provenientes de DIA	56
5.1. Determinación de las capacidades cuantitativas del <i>Q-Score</i> y determinación del rango lineal	57
6. Inmunoblots	58

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
------------------------------------	-----------

1. Estudio del comportamiento del proteoma de VSMC estimuladas con AngII mediante nuevas aproximaciones de análisis de biología de sistemas.....	61
--	----

1.1.	Caracterización del proteoma profundo de VSMC	61
1.2.	Análisis cuantitativo en profundidad de los cambios dinámicos producidos en el proteoma de VSMC sujetos a tratamiento con AngII	64
1.3.	Evidencia de que el comportamiento coordinado de las proteínas se va adquiriendo con el tiempo	67
1.4.	AngII promueve cambios de proteína coordinados consistentes con un fenotipo hipertrófico y contráctil de VSMC	71
1.5.	AngII induce alteraciones coordinadas de proteínas que son reflejo de la migración, la represión de la proliferación celular y secreción	75
1.6.	Las proteínas <i>outlier</i> mantienen su comportamiento no coordinado en el tiempo y tienden a jugar papeles funcionalmente diferenciales	80
2.	Desarrollo y aplicación de nuevas aproximaciones de adquisición de datos mediante DiS	83
2.1.	Cálculo de la tasa de error de identificación de péptidos provenientes de DiS	83
2.2.	Mejora de las prestaciones en adquisición por DiS	85
2.3.	El <i>Q-Score</i> un parámetro cuantitativo para DiS	86
2.4.	Aplicación del método DiS al estudio del interactoma de RCAN1	88
2.4.1.	Análisis cuantitativo del interactoma basal de RCAN1 en cerebro	89
2.4.2.	Caracterización del interactoma basal y activado de RCAN1 en explantes de aorta	94
2.4.2.1.	Caracterización del interactoma de RCAN1.4	97
CONCLUSIONES.....		101
BIBLIOGRAFÍA		105
ANEXOS.....		127

RESUMEN

La mayoría de los trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, implican procesos vasculares como la hipertensión, la restenosis, la aterosclerosis y el desarrollo de aneurismas abdominales aórticos. Estos procesos tienen como característica estructural común el remodelado vascular, donde las células de músculo liso vascular (VSMC) juegan un papel central. Existen múltiples evidencias que implican a la angiotensina II (AngII) en este proceso, así como a la ruta de señalización calcineurina (CN)/NFAT, y en especial al regulador de calcineurina 1 (RCAN1). Sin embargo, cómo AngII media el remodelado vascular en VSMC en etapas tempranas del proceso, qué rutas de señalización y mediadores moleculares están implicadas, así como con qué otras rutas está conectando RCAN1 en éstas células, son cuestiones que permanecen sin resolver.

En la primera parte de este trabajo se ha hecho el estudio más profundo y detallado hasta la fecha del efecto de AngII sobre VSMC a distintos tiempos de tratamiento. Para ello, se ha empleado proteómica cuantitativa combinada con un análisis de biología de sistemas basado en un algoritmo nuevo desarrollado en nuestro laboratorio, denominado Triángulo de Biología de Sistemas (SBT), que ha permitido tener una visión global de las rutas reguladas por AngII en estas células. Además, a diferencia de otros algoritmos ampliamente utilizados por la comunidad proteómica, el SBT permite estudiar los cambios funcionales producidos por la acción coordinada de proteínas. Gracias a este algoritmo se han revelado detalles moleculares sin precedentes de la respuesta proteica temprana de VSMC a AngII. Esta respuesta incluye la activación de proteínas de síntesis, plegamiento, renovación y contracción muscular, consistente con un fenotipo claramente contráctil; a la vez que una inducción de la migración y la represión de la proliferación celular y la secreción. Finalmente, es de destacar que la mayoría de las categorías funcionales alteradas fueron complejos proteicos, redes de interacción o rutas metabólicas.

En la segunda parte del trabajo se ha realizado un estudio del conjunto de proteínas que interaccionan con RCAN1 para intentar explicar la resistencia de los ratones *Rcan1*^{-/-} contra el desarrollo de procesos patológicos de remodelado vascular. Para ello, desarrollamos un nuevo método de adquisición independiente de intensidad iónica (DiS) que incrementa el número de proteínas poco abundantes que somos capaces de identificar debido al gran rango dinámico de las muestras. Utilizando la aproximación DiS nuestros resultados demostraron un notable aumento del rendimiento en la identificación y cuantificación de proteínas en comparación con otras aproximaciones de proteómica masiva y una sensibilidad similar a tecnologías dirigidas como SWATH. La aplicación de la nueva tecnología de adquisición al análisis de inmunoprecipitados de RCAN1 en ratones silvestres y *Rcan1*^{-/-} en arteria bajo estimulación con AngII, reveló que la isoforma inducible RCAN1.4 parece interaccionar con una red de proteínas implicadas en la respuesta temprana de las VSMC además de otras relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga, lo que podría explicar la resistencia de los ratones deficientes en *Rcan1* a generar enfermedades relacionadas con el remodelado vascular.

ABSTRACT

Most of the disorders of the heart and blood vessels involve vascular processes such as hypertension, restenosis, atherosclerosis and the development of aortic abdominal aneurysms. The common underlying process of all these pathologies is the vascular wall remodeling, where vascular smooth muscle cells (VSMC) play a central role. Multiple lines of evidence involve angiotensin II (AngII) in this process, as well as the calcineurin (CN)/NFAT signaling pathway and especially the calcineurin 1 regulator (RCAN1). However, how AngII mediates vascular remodeling in VSMC, which signaling pathways are involved, especially the ones mediated by RCAN1 in these cells, are issues that remain unresolved.

In the first part of this work, we performed the deepest and most detailed study to date of the effect on VSMC proteome treated with AngII at different times. For this, we applied a quantitative proteomics approach combined with a systems biology analysis based on a new algorithm developed in our laboratory, called the Systems Biology Triangle (SBT), which allowed us to have an overview of the paths regulated by AngII in these cells. Moreover, in contrast to other algorithms widely used by the proteomics community, the SBT allows the study of the functional changes produced by the coordinated action of proteins. Thanks to this algorithm, we unveiled the early protein response of VSMC to AngII with unprecedented molecular detail. This response includes the activation of synthesis, folding, and renewal of proteins and muscle contraction, consistent with a clear contractile phenotype; and at the same time an induction of migration and repression of cell proliferation and secretion. Notably, most of the functional categories altered were protein complexes, interaction networks and metabolic pathways.

In the second part of the work, was studied the proteins that interact with RCAN1 to try to explain the resistance of *Rcan1*^{-/-} mice against the development of pathological processes of vascular remodeling. To do this, we developed a new method of data independent acquisition (DiS) that improves the sensitivity allowing the identification of more nonabundant proteins. This method was applied to the analysis of RCAN1 immunoprecipitated samples in control and *Rcan1*^{-/-} mice. The first analysis was done in brain, where RCAN1 has a high level of expression. Finally, the method was applied to study the AngII-regulated interactome of RCAN1 in VSMC, revealing potential novel RCAN1.4 interacting proteins in vessels. Many of those proteins are related to the fatty acid metabolism and are also involved in the primary phenotypic response of VSMC to AngII.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ABC	Tampón bicarbonato amónico del inglés <i>Ammonium Bicarbonate</i>
ACN	Acetonitrilo
AGC	Control automático de ganancia del inglés <i>Automatic Gain Control</i>
AngII	Angiotensina II
AT1R	Receptor de Angiotensina II tipo 1
AT2R	Receptor de Angiotensina II tipo 2
CID	Disociación inducida por colisión del inglés <i>Collision-Induced Dissociation</i>
CMLV o VSMC	Células de músculo liso vascular o en inglés <i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>
CN	Calcineurina
COX2 o PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
DDA o DdS	Adquisición o Escaneo dependiente de datos del inglés <i>Data-Dependent Adquisition or Scanning</i>
DIA o DiS	Adquisición o Escaneo independiente de datos del inglés <i>Data-Independent Adquisition or Scanning</i>
DMEM	Medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco del inglés <i>Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium</i>
FA	Ácido Fórmico del inglés <i>Formic Acid</i>
FBS	Suero feral bovino del inglés <i>Fetal Bovin Serum</i>
FCS	Puntuación funcional de clase del inglés <i>Functional Class Scoring</i>
FDR	Tasa de falsos descubrimientos del inglés <i>False Discovery Rate</i>
FWHM	Anchura del pico a la mitad de la altura máxima del inglés <i>Full Width at Half Maximum</i>
GIA	Algoritmo General de Integración del inglés <i>General Integration Algorithm</i>
GO	Ontología Génica del inglés <i>Gene Ontology</i>
HCD	Disociación por colisión a alta energía del inglés <i>Higher-energy Collisinal Dissociation</i>
HPLC	Cromatografía líquica de altas prestaciones del inglés <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
ICAT	Marcaje por afinidad de isótopos codificados del inglés <i>Isotope-Coded Affinity Tags</i>

iTRAQ	Marcaje isobárico para cuantificación absoluta y relativa del inglés <i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation</i>
KEGG	Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas del inglés <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KO	<i>Knock out</i>
LC	Cromatografía líquida del inglés <i>Liquid Chromatography</i>
m/z	masa/carga
MS	Espectro de masas o espectrómetro de masas del inglés <i>Mass Spectrum or Spectrometry</i>
MS² o MS/MS	Espectro de fragmentación
NFAT	Factor nuclear de células T activadas del inglés <i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
ORA	Algoritmos de Sobre-representación del inglés <i>Over-Representation Algorithm</i>
PPINs	Redes de interacción proteína-proteína del inglés <i>Protein-Protein Interactions Networks</i>
PTMs	Modificaciones post-traduccionales del inglés <i>Post-Translational Modifications</i>
RCAN1	Regulador de Calcineurina 1
RP	Fase inversa del inglés <i>Reverse Phase</i>
SBT	Triángulo de Biología de Sistemas del inglés <i>Systems Biology Triangle</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SILAC	Marcaje isotópico estable por aminoácidos del inglés <i>Stable Isotope Labeling by/with Amino acids</i>
TBS-T	Búfer salino Tris y Tween del inglés <i>Tris-Buffered Saline and Tween</i>
TFA	Ácido Trifloro Acético del inglés <i>Trifluoroacetic Acid</i>
WSPP	Escan, péptido y proteína ponderados del inglés <i>Weighted Scan, Peptide and Protein</i>
WT	Silvestre del inglés <i>WildType</i>
XIC	Cromatograma extraído de un ión del inglés <i>eXtracted Ion Chromatogram</i>

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en todo el mundo, teniendo especial incidencia en el mundo desarrollado. Según los últimos informes de la Organización Mundial de la Salud se proyectaron cerca de 18 millones de muertes para 2015 lo que supone casi dos tercios del total de muertes para ese año, y que podrían llegar a cerca de 23 millones para 2030 [1], de las cuales el 95% tienen relación con algún tipo de patología vascular. De ahí la importancia de comprender los mecanismos fisiológicos y moleculares por los cuales tienen lugar estas enfermedades. Y ya que las proteínas son los efectores primarios de todas las funciones celulares, mucho del trabajo para comprender dichos mecanismos se ha centrado en el estudio del papel de las proteínas en múltiples sistemas cardiovasculares. Una de las aproximaciones más efectivas de estudiar las proteínas es a través del análisis proteómico, el cual permite analizar un amplio rango de proteínas o péptidos, tanto celulares como extracelulares durante los diferentes procesos fisio/patológicos cardiovasculares.

1. Sistema cardiovascular

Los organismos pluricelulares complejos, por su gran tamaño y alta actividad metabólica, hacen insuficiente la simple difusión para el intercambio de nutrientes y oxígeno con el medio. Por este motivo, el sistema cardiovascular es el primero de los sistemas funcionales en desarrollarse durante la embriogénesis de animales superiores [2]. El sistema cardiovascular está constituido por una bomba central, el corazón, conectada a una red de vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) que conforman una estructura altamente ramificada y organizada que permite el aporte de nutrientes y oxígeno a todos los tejidos del organismo.

1.1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR

La arquitectura general y la composición celular de los vasos sanguíneos a través de todo el árbol vascular son similares. Aunque existen especializaciones estructurales de acuerdo al papel funcional del tipo específico de vaso que alteran el grosor y la composición celular de las diferentes capas. Por ejemplo, para un nivel similar de ramificación, generalmente las arterias son más gruesas que las venas para adaptarse a los flujos pulsátiles y la presión sanguínea más alta. Aunque los trastornos venosos no son inconsecuentes, la mayoría de las lesiones vasculares significativamente clínicas son arteriales [1], los principales vasos sanguíneos que transportan la sangre oxigenada desde el corazón al resto del organismo, a excepción de la arteria pulmonar y umbilical, que lo hacen en sentido inverso.

Este tipo de vasos son imprescindibles para el mantenimiento fisiológico del tono vascular, ya que son el principal órgano efector de la regulación del mismo; regulando los

cambios de presión y flujo de sangre gracias a su naturaleza elástica y contráctil proporcionada por su estructura. En un corte transversal, desde la luz del vaso sanguíneo hasta la capa más externa, nos encontramos con tres capas o túnica concéntricas bien definidas: capa íntima, media y adventicia. Esta estructura bien organizada garantiza la integridad y funcionalidad de los vasos [3] (Figura I. 1).

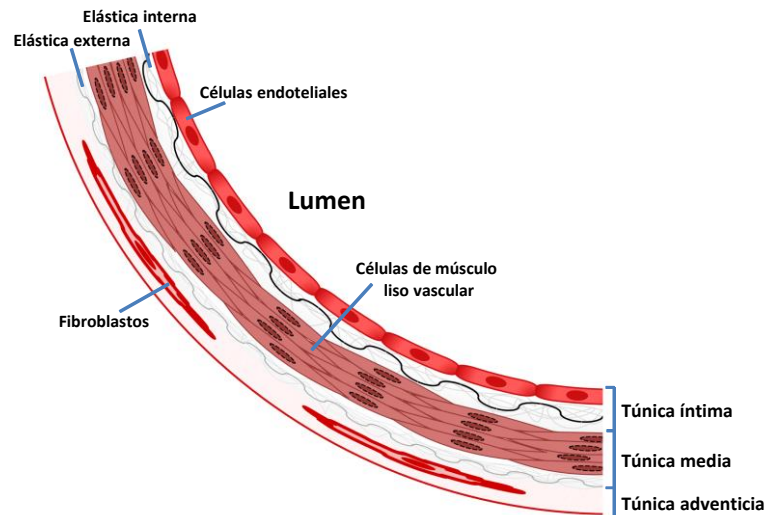


Figura I. 1. Representación esquemática de una sección transversal de una arteria muscular. Desde la luz del vaso sanguíneo hasta la capa más externa nos encontramos con diferentes estructuras o capas. La capa que se enfrenta al lumen del vaso se denomina *capa íntima*, delimitada por las células endoteliales. Está separada de la capa media por la denominada *lámina elástica interna*. La *capa media* está básicamente formada por células de músculo liso, que permiten la contracción y dilatación de los vasos. Posteriormente encontramos la *lámina elástica externa* que separa la capa media de la *adventicia*, compuesta por fibras de colágeno y fibroblastos, en la que encontramos los vasos que irrigan los propios vasos (*vasa vasorum*) y múltiples inervaciones nerviosas. Modificado a partir de la **Figura 11.1 A** de **Robbins y Cotran** en la séptima edición de ***Pathologic Basis of Disease* (2005)**.

La túnica íntima o interna forma el recubrimiento interno de los vasos que está en contacto directo con la sangre a medida que fluye a través del lumen. Está constituida por un simple epitelio escamoso, denominado endotelio. Las células endoteliales actúan como barrera pasiva entre la sangre y el resto de la pared vascular, aunque hoy en día se conoce que las células endoteliales juegan un papel activo en una amplia variedad de funciones de los vasos, incluyendo, influencia sobre el flujo de sangre, secreción local de mediadores químicos que modulan en cierto grado el estado contráctil de los vasos y asisten a la permeabilidad de los mismos [3]. El segundo componente de la túnica interna es la membrana basal que proporciona soporte físico a la capa epitelial. Las fibras de colágeno que la componen anclan el endotelio y proporciona capacidad de resistencia al estiramiento y retroceso. Además desempeña un papel importante en la orientación de los movimientos celulares durante la reparación de los tejidos de la pared vascular [4]. La parte más externa de la túnica interna, que forma el límite entre la túnica interna y media, es la lámina elástica interna, una delgada lámina de fibras elásticas con un número variable de aberturas que facilitan la difusión de moléculas y células hacia capas más profundas [5].

La túnica media es una capa de tejido muscular y conectivo que muestra la mayor variabilidad entre los diferentes tipos de vasos. En la mayoría de los vasos, se trata de una capa relativamente ancha compuesta principalmente por células de músculo liso vascular (CMLV o *Vascular Smooth Muscle Cells*, VSMC) dispuestas helicoidalmente en capas y cantidades sustanciales de fibras y láminas elásticas, fibras reticulares y proteoglicanos todos ellos producidos por las células de músculo liso. Además este tipo de células suelen estar unidas por uniones tipo Gap lo cual permite que cumplan su papel primario de regular el diámetro del lumen gracias a su naturaleza contráctil [5].

Profundizando en la estructura del vaso tenemos la lámina elástica externa que separa la capa media de la adventicia o externa. Esta última, formada por una red de tejido conectivo formada por fibras de colágenos, fibroblastos [5] y nos encontramos los vasos que irrigan los propios vasos, sobre todo aquellos de gran diámetro; los denominados *vasa vasorum* y múltiples inervaciones [5].

2. Remodelado vascular

La mayoría de los trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, aparte de las cardiopatías reumáticas o congénitas, implican procesos vasculares como la hipertensión, la restenosis o formación de neoíntima, la aterosclerosis y el desarrollo de aneurismas abdominales aórticos. Todos estos procesos tienen como característica estructural fundamental común el remodelado vascular [6-8]. El remodelado de la pared vascular implica modificaciones estructurales y funcionales que cambian la masa de la túnica media, el volumen del lumen de los vasos y ocurre en respuesta a varios estímulos, como cambios en la presión arterial, respuesta inflamatoria, alteración de la composición de la matriz extracelular y daño mecánico de los vasos.

2.1. PAPEL DE LAS VSMC EN EL REMODELADO VASCULAR

Gran parte de las alteraciones sufridas por la pared vascular son consecuencia del papel que juegan las VSMC que debido a su gran plasticidad pueden experimentar cambios reversibles en su fenotipo en respuesta a cambios ambientales. En condiciones fisiológicas, la pared vascular está expuesta continuamente a cambios hemodinámicos tales como variaciones de presión en el lumen de los vasos y otras fuerzas de cizalla [9]. En esas condiciones, las VSMC que conforman la capa media se encuentran en estado quiescente, presentando un fenotipo mayoritariamente contráctil. Estas células son capaces de contraerse o relajarse en función de las necesidades, manteniendo el tono vascular por dilatación o constricción del vaso [10, 11]. Sin embargo, en condiciones de daño o reparación fisio/patológica de la pared vascular se induce un cambio fenotípico en las propias VSMC, que pasan a adoptar un fenotipo predominantemente migratorio y

proliferativo [12]. En esta compleja respuesta participan otros tipos celulares y la integración de un gran número de estímulos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), o la angiotensina II (AngII) [12]. Estos cambios fenotípicos pueden ser reversibles, por lo que, posteriormente a la reparación, las VSMC son capaces de retomar su fenotipo contráctil. Si por el contrario no lo hacen, debido a un mantenimiento de las señales proliferativas, se desencadenan los fenómenos de remodelado vascular y la aparición de lesiones en la capa íntima [10, 11, 13].

2.2. PAPEL DE LA ANGII EN EL REMODELADO VASCULAR

Existen múltiples líneas de evidencia que apoyan la implicación de la AngII en el remodelado vascular [14-17], sin embargo, cómo la AngII media en este proceso es una cuestión que permanece sin resolver y poco se sabe acerca de las rutas de señalización y mediadores moleculares implicados, particularmente en las fases iniciales del proceso, donde la respuesta puede ser mejor atribuida a la acción directa de la propia AngII.

Para entender mejor el mecanismo por el que la AngII media el remodelado vascular cabe destacar su implicación en el mecanismo de regulación del tono vascular. La sangre, que circula debido al impulso generado por el trabajo cardíaco y gracias a las propiedades mecánico-elásticas y estructura de los vasos sanguíneos, discurre alrededor del circuito vascular ejerciendo una tensión sobre la pared de los vasos denominada presión sanguínea, que se registra de manera desigual en las diferentes localizaciones del árbol vascular, dependiendo de las necesidades tisulares que controlan de manera local el flujo sanguíneo [18]. A nivel sistémico, el tono vascular es regulado por una compleja red de mecanismos que responden a las variaciones en la homeostasis vascular. Una pérdida de volumen sanguíneo, una caída de la presión sanguínea o un aumento en la osmolaridad del plasma e incluso variaciones en la concentración de gases son rápidamente detectados por sendos receptores presentes en diferentes tejidos y áreas arteriales: barorreceptores y osmorreceptores que participan esencialmente en la inervación simpática y parasimpática, si bien esta última contribuye de manera más importante en la regulación de la función cardíaca [18]; produciendo reflejos en el centro vasomotor de la base cerebral y en otros núcleos y áreas cerebrales [18] que desencadenan una vasoconstricción sistémica y la liberación de renina por parte del riñón. Esta proteasa hidroliza su único sustrato, el angiotensinógeno, en el plasma para liberar el decapeptido angiotensina I. Este péptido, a su vez es metabolizado en AngII a su paso por los pulmones por la enzima convertidora de angiotensina (ACE), formando un octapéptido que es la molécula activa del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) [19].

El péptido efector del SRAA, la AngII, es una molécula con tal poder vasoconstrictor que solo un microgramo es capaz de aumentar la presión arterial de un ser humano por

encima de 50 mmHg [18]. En condiciones fisiológicas, en primer lugar, la AngII media en la vasoconstricción periférica ejerciendo su efecto sobre las arteriolas, y posteriormente sobre los túbulos renales provocando la reabsorción de agua y sodio [20] y provoca la secreción de aldosterona de las glándulas suprarrenales, que a su vez aumenta la reabsorción de sal y agua [18]. A nivel celular, la AngII contribuye en condiciones patológicas a la disfunción de las VSMC actuando sobre varios procesos clave. Es capaz de regular el crecimiento celular, interviniendo en procesos de proliferación, hipertrofia y apoptosis de estas células, de producir fibrosis e incluso de estimular la migración de las propias VSMC, un evento clave en el proceso de remodelado vascular [14, 21]. Cabe destacar que la acción de AngII sobre VSMC parece estar determinada por el tiempo de exposición; en condiciones fisiológicas, AngII ejerce su función de manera puntual, persiste en sangre sólo durante 1-2 min. y es rápidamente inactivada por enzimas tisulares [18], sin embargo, la exposición crónica induce un fenotipo migratorio y proliferativo de estas células y la secreción de componentes de matriz extracelular, ambos procesos implicados en el desarrollo y mantenimiento de patologías de formación de neoíntima [4].

La AngII actúa a través de la unión a dos subtipos diferentes de receptores, ambos son receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteína G: el receptor de angiotensina tipo I y II, codificados por los genes AT1R y AT2R, respectivamente [22, 23]. Ambos receptores unen la AngII con afinidad nanomolar, pero con consecuencias muy diferentes [24]. El AT1R media en la gran mayoría de los efectos cardiovasculares que se atribuyen a la AngII [25], ya que se expresa principalmente en los órganos implicados en la regulación de la presión sanguínea como: el corazón (tanto en cardiomiocitos como fibroblastos), en los vasos sanguíneos (principalmente en las VSMC), en el riñón, en la glándula adrenal, en los pulmones y en el cerebro [26]. El AT2R, por otra parte, se expresa a niveles altos durante el desarrollo embrionario y su presencia es casi residual en tejido adulto [27], localizándose principalmente en útero, riñón, pulmón y corazón [28], aunque en el trabajo desarrollado por Touyz y colaboradores [14] se describe que su expresión puede regularse en condiciones patológicas de remodelado vascular y cardiaco y en condiciones inflamatorias. Ambos receptores, AT1R y AT2R, juegan papeles fundamentales en la regulación vascular, pero mediante acciones opuestas [29]. Mientras que AT1R participa en el incremento de la presión sanguínea [30], promueve el crecimiento celular [31], la fibrosis [14], y la producción de citoquinas pro-inflamatorias [32], el receptor AT2 puede inducir vasodilatación y disminuir la inflamación, la fibrosis y el crecimiento celular [24], incluso en ausencia del ligando [33]; a través de rutas relacionadas con proteínas tirosina fosfatasa (SHP-1) [34], caspasas y p38 [35] y la ruta de señalización que median Rap1/B-Raf [36], esta última principalmente en tejido neuronal.

Las rutas de señalización en VSMC derivadas de la unión de la AngII con AT1R desencadenan una respuesta multifactorial compleja que incluye: la cascada de

señalización mediada por fosfolipasa C (PLC), inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3) y 1-2 diacilglicerol [37] que finalmente regula la movilización de calcio intracelular [38]; la ruta de proteínas quinasas activadoras de mitógeno (MAPK) [39]; las proteínas intracelulares tirosin quinasas Pyk2, Src y JAK/STAT [40]; o la vía de RhoA/Rho quinasas [41].

Además, la AngII puede mediar otras acciones celulares a través de la activación de la NAD(P)H oxidasa que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales tienen un papel fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria [42].

2.3. PAPEL DE RCAN1 EN EL REMODELADO VASCULAR

Cabe destacar la relación que tiene en el aumento de la concentración citoplasmática de calcio, debido a que activa a su vez otras rutas de señalización implicadas en multitud de procesos patofisiológicos entre los que se incluyen el desarrollo del sistema vascular [43, 44] y la hipertrofia cardíaca [44, 45]: la ruta de señalización calcineurina (CN)/NFAT.

La CN es una serín-treonín fosfatasa heterodimérica formada por una subunidad catalítica, CNA, y una subunidad reguladora, CNB, [46]. El sustrato más importante y mejor caracterizado es la familia de factores de transcripción NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*). En células en reposo, NFATc1-c4 se encuentran altamente fosforilados en el citoplasma. Cuando la célula recibe estímulos que provocan un aumento de calcio intracitoplasmático, la fosfatasa se activa y desfosforila a las serinas presentes en la región reguladora del NFAT [47]. Como consecuencia, NFAT se trasloca rápidamente al núcleo celular donde interacciona con secuencias de *DNA* específicas [48], regulando la transcripción de determinados genes diana implicados en procesos de angiogénesis, como la ciclooxigenasa 2 (PTGS2 ó COX2) [49] o el regulador de calcineurina 1 (RCAN1) [50].

Se ha implicado a RCAN1 en multitud de procesos fisiológicos y patológicos. Originariamente se le atribuyeron diferentes papeles en la respuesta inmune e inflamatoria debido a su asociación con las inmunodeficiencias encontradas en pacientes de síndrome de Down [51], pero posteriormente su expresión se ha asociado con otros procesos entre los que se incluyen el crecimiento tumoral [52], angiogénesis [53], sepsis [54], función de mastocitos [55] y plasticidad sináptica y la memoria [56]. En el sistema cardiovascular, se ha estudiado el papel de RCAN1 en hipertrofia cardíaca [57], mientras que existe solamente un limitado número de estudios del papel de esta proteína en el desarrollo de los procesos fisiopatológicos de la pared vascular [58]. Méndez-Barbero y colaboradores [58] observan que la deficiencia de RCAN1 confiere a los ratones una remarcable resistencia contra el desarrollo de procesos patológicos de remodelado vascular como aneurismas y restenosis inducidos por AngII, sin embargo, a nivel molecular, no se detalla en ningún caso con qué otras rutas está conectando RCAN1 que expliquen los fenotipos observados. Por ese motivo, se hace imprescindible conocer las proteínas que interaccionan específicamente con RCAN1 y en qué otras rutas celulares están implicadas.

Por eso en este trabajo hemos desarrollado nuevas herramientas proteómicas para caracterizar el interactoma basal y estimulado con AngII de RCAN1 en VSMC.

3. Proteómica basada en Espectrometría de Masas

El objetivo principal de la proteómica, término empleado por primera vez por Williams en 1994, es la caracterización detallada del proteoma. Dentro del marco conceptual del dogma central de la biología molecular, se ha venido enfocando en la exhaustiva identificación y caracterización de secuencias de proteínas, incluyendo sus modificaciones postraduccionales (PTMs), y la cuantificación de los componentes proteicos de una muestra biológica.

La mayoría de los estudios proteómicos usan la espectrometría de masas en tándem como tecnología de base, específicamente en métodos conocidos como proteómica *bottom-up* (*de abajo arriba*) o basada en la identificación de las proteínas a partir de sus péptidos. En este tipo de aproximación, las muestras de proteínas extraídas de células o tejidos son digeridas en péptidos. Los péptidos resultantes son separados, generalmente mediante cromatografía líquida (LC), ionizados y transferidos a un espectrómetro de masas (MS), donde se mide la relación masa-carga (m/z) de los iones generados. En un método de análisis general, los péptidos son descompuestos al inducir su colisión con moléculas de gas neutro como helio, nitrógeno o argón (*Collision-Induced Dissociation*, CID); posteriormente estos iones fragmentos conforman los espectros de fragmentación (MS^2 o MS/MS). La propia señal de los iones puede ser utilizada para inferir la cantidad de péptido de determinada muestra [59, 60]. Para cada paso del proceso, incluyendo la preparación y fraccionamiento de la muestra, la adquisición de datos de espectrometría de masas, la cuantificación y el análisis de datos, se han desarrollado multitud de métodos y herramientas [59-63]. Esto también es aplicable a la instrumentación, la cual ha sufrido un espectacular desarrollo en los últimos 10 años en rendimiento referido a precisión de masa, sensibilidad y robustez analítica [64], desplazando completamente a cualquier otro tipo de técnica para el análisis de mezclas complejas de proteínas.

Para cada uno de los pasos del proceso de preparación de la muestra existe una extensa variedad de opciones que han sido combinadas en múltiples flujos de trabajo, pero además, estos se pueden combinar con varias estrategias de espectrometría de masas (Figura I. 2), cada una de las cuales puede estar dirigida a responder distintas preguntas biológicas [59, 60, 62] y ser aplicadas a varios tipos de muestras, como proteomas completos o fracciones enriquecidas, tales como inmunoprecipitaciones o fracciones subcelulares.

La estrategia más utilizada es conocida como proteómica no dirigida o *shotgun*. En esta, los iones del péptido precursor son detectados en espectros de reconocimiento

(*survey scans*) en los que son seleccionados automáticamente dependiendo de su intensidad usando un simple algoritmo heurístico a través de un tipo de análisis denominado análisis dependiente de datos (*Data-Dependent Analysis*, DDA o DdS). Esta estrategia resulta en un conjunto de datos que permiten identificar y cuantificar comparativamente un enorme número de proteínas entre muestras, bien mediante marcaje isotópico o sin marcaje (cuantificación *label-free*) [65-68]. La proteómica *shotgun* no requiere en principio ningún tipo de conocimiento acerca de la composición de la muestra. En la proteómica condicionada (*directed*) en cambio, sólo los precursores presentes en una lista de iones precursores predeterminados, generalmente conocida como lista de inclusión, son seleccionados, para la fragmentación [69, 70]. En la proteómica dirigida (*targeted*), solamente los péptidos predefinidos son seleccionados para la detección y cuantificación en una muestra. El método principal en el que se apoya la proteómica dirigida es la monitorización de reacciones seleccionadas o *Selected Reaction Monitoring* (SRM) también conocido como monitorización múltiple de reacciones o *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) [71, 72]. Típicamente aplicable a decenas o cientos de péptidos con un gran rango dinámico [60, 73]. Estas dos últimas formas de adquisición son independientes de la intensidad de los iones generados aunque se centran exclusivamente en los iones preseleccionados. Gracias a los recientes avances en la instrumentación, está emergiendo una estrategia conocida como adquisición de datos independiente de intensidad (*Data-Independent Analysis*, DIA o DiS) [74-77] para el análisis no dirigido de todas las especies de péptidos presentes en una muestra, en la que no se precisa de la selección de los iones precursores.

La mayor parte de los estudios proteómicos dentro del paradigma de la biología molecular, han estribado en incrementar la cobertura del proteoma caracterizado, identificado y cuantificado [78]. Estos objetivos han sido técnicamente difíciles de alcanzar, pero, desde el punto de vista conceptual son bastante simples. Importantes proyectos han alcanzado un alto grado de cobertura de los proteomas [79, 80] y han estimado la concentración absoluta de importantes fracciones del proteoma [79, 81-83]. En muchos de estos, el resultado principal es una lista de proteínas cuya abundancia se ve modulada. Típicamente, uno o varios de los elementos de esta lista son posteriormente validados por métodos de bioquímica clásica o de biología celular, una estrategia altamente satisfactoria pero, que no resulta del todo completa ya que ignora la mayoría de la información proteómica adquirida. Alternativamente, las listas generadas son sujetas a análisis por herramientas de enriquecimiento por ontologías génicas, rutas o bases de datos de transducción de señales, o bases de datos de interacción proteína-proteína [84, 85]. El objetivo de este tipo de análisis es (a) relacionar los contenidos de las listas con el conocimiento que se disponga *a priori* de las listas en la forma de clases funcionales de proteínas o rutas o (b) proporcionar conceptos visuales de los procesos celulares, en forma

de redes [86]. Algunas de estas aproximaciones son vistas por algunos autores como medidas *a posteriori* en forma de red pero dentro del paradigma de la biología molecular [87].

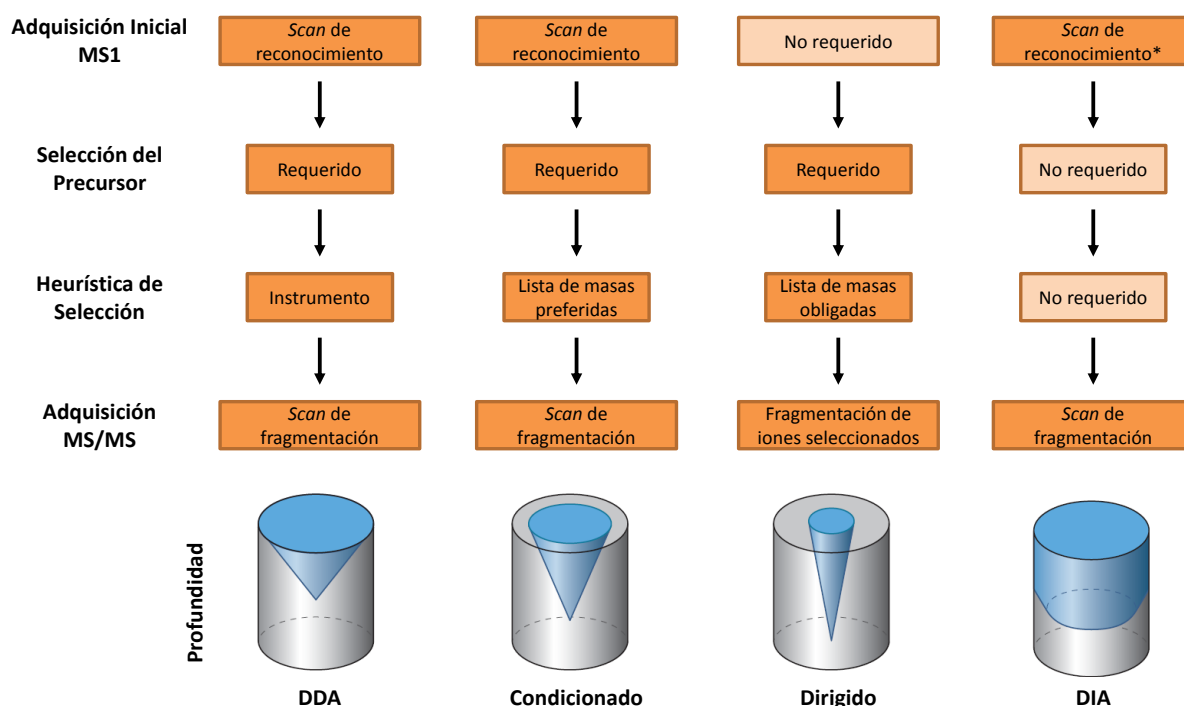


Figura I. 2. Estrategias fundamentales de proteómica basada en espectrometría de masas en tandem. La estrategia más frecuentemente utilizada es la no dirigida o *shotgun* (DDA), esta estrategia permite identificar una enorme cantidad de proteínas en muestras biológicas, pero, la reproducibilidad está sesgada hacia las proteínas más abundantes. En la proteómica condicionada, determinadas partes del proteoma son cuantificadas con mayor reproducibilidad y sensibilidad que en la no dirigida. La proteómica dirigida genera un conjunto de datos altamente reproducibles, muy sensible y con un amplio rango dinámico de pocos cientos de péptidos. La cuarta estrategia conocida como adquisición de datos independiente de intensidad (*Data-Independent Acquisition* o DIA) en el que se intentan identificar todas las proteínas presentes en cada muestra.

3.1. PROTEÓMICA CUANTITATIVA

El análisis cuantitativo a gran escala de proteomas constituye uno de los retos más importantes en la proteómica basada en espectrometría de masas. La determinación de los niveles de proteína en diferentes tipos celulares y condiciones fisiológicas o patológicas es un paso necesario para la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes en los procesos celulares y es fundamental para el desarrollo de la biología de sistemas.

En paralelo al desarrollo tecnológico y de las diferentes estrategias de adquisición de datos MS se han desarrollado varias estrategias cuantitativas. De acuerdo al tipo de información que nos proporciona, las técnicas se pueden clasificar en: (a) cuantificación relativa, en la que se comparan las cantidades de proteínas o proteomas completos entre muestras dándonos como resultado un ratio cuantitativo y (b) cuantificación absoluta, proporcionándonos información acerca de la cantidad o la concentración de una proteína dentro de una muestra. Una clasificación alternativa, puede estar basada en la metodología subyacente, así tendríamos aproximaciones: (a) basadas en marcaje

isotópico estable, que implicaría el marcaje químico o enzimático de péptidos o proteínas y (b) aproximaciones libre de marca o *label-free*, en las cuales las muestras mantienen sus propiedades isotópicas naturales y la comparación cuantitativa se realiza midiendo la intensidad de los péptidos entre distintas carreras cromatográficas correspondientes a cada muestra.

La espectrometría de masas es una técnica que mide los ratios masa-carga de analitos cargados y que no permite por sí misma la cuantificación de la cantidad de partículas presentes en las muestras. Debido a las diferencias existentes en las propiedades fisicoquímicas de los diferentes péptidos o proteínas, sus señales en el MS no pueden ser utilizadas para comparaciones cuantitativas entre diferentes especies moleculares. Además, la eficiencia de ionización, que influye directamente en la capacidad del analito de ser detectado no solo depende de las propiedades fisicoquímicas de la molécula sino también de las otras moléculas que le acompañan en cada momento de la ionización. Por tanto, la cuantificación en proteómica se basa esencialmente en la comparación de una misma molécula entre diferentes experimentos, o la comparación dentro del mismo experimento de moléculas que difieran tan solo en su composición isotópica y que por tanto tengan idénticas propiedades fisicoquímicas y que su contexto en la ionización sea similar.

3.1.1. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa proporciona un cálculo de los ratios de abundancia entre péptidos y proteínas por comparación de sus señales originadas a partir de diferentes muestras. Normalmente, es llevada a cabo en estrategias no dirigidas, permitiendo obtener el perfil cuantitativo de cientos de miles de péptidos pertenecientes a hasta más de diez mil proteínas [88].

3.1.1.1. Métodos de marcaje isotópico estable

La mayoría de los métodos de cuantificación relativa hacen uso de marcaje estable con isótopos pesados de ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O y ^2H . Estos isótopos pueden ser introducidos en las proteínas mediante incorporación de aminoácidos marcados en el medio de cultivo (SILAC [89]), mediante la utilización de reactivos químicos con idénticas propiedades fisicoquímicas (como iCAT [90] o iTRAQ [91]), o mediante marcaje enzimático (marcaje con ^{18}O del extremo C-terminal de péptidos tripticos, [92]).

Marcaje metabólico

El marcaje metabólico con isótopos estables introduce la marca durante el crecimiento y la división celular. Esto se consigue alimentando a los organismos con un

medio que contiene un subconjunto de metabolitos, tales como aminoácidos esenciales, marcados con isótopos pesados. El marcaje metabólico asegura menores desviaciones en la cuantificación de proteínas ya que las muestras en las diferentes condiciones son mezcladas en etapas iniciales del experimento, antes de la digestión trípica. El marcaje simple con medio que contiene ^{15}N ha sido llevado a cabo satisfactoriamente [93-97] consiguiendo una buena incorporación de los isótopos, pero las diferencias de masas dependen del número de átomos de ^{15}N presentes en los diferentes péptidos por lo que presenta grandes dificultades el análisis de los datos y la cuantificación.

Un método computacionalmente mucho más simple fue desarrollado para solucionar este tipo de problemas. El marcaje SILAC [98] toma ventaja del hecho de que ciertos organismos son auxotróficos para ciertos aminoácidos. Estos aminoácidos pueden ser proporcionados en forma marcada o no marcada al medio de cultivo y ser incorporados por el organismo para la síntesis de sus proteínas *in vivo*. Los experimentos SILAC generalmente emplean lisina y arginina marcadas con diferente número de isótopos pesados ^{13}C , ^{15}N y ^2H . Usando tripsina como proteasa de digestión se asegura que cada péptido resultante contendrá al menos un aminoácido marcado (excepto el péptido del extremo C-terminal de la proteína). La cuantificación se realiza por comparación de las intensidades de la envoltura isotópica de los péptidos marcados y no marcados de la misma secuencia. Este análisis ha sido apoyado por el desarrollo de herramientas informáticas como el software MaxQuant [99]. Esta técnica es aplicada no solo en cultivo, sino también a organismos completos como *Drosophila* [100] o ratones [101].

La consideración más importante a tener en cuenta usando SILAC es la conversión metabólica de los aminoácidos marcados isotópicamente en la célula. Esto puede llevar a dar a una cuantificación incorrecta si la ruta que lleva a la conversión de arginina a prolina es estimulada cuando la concentración de arginina no se ajusta correctamente [102].

Marcaje químico

Los métodos de cuantificación relativa por marcaje químico se basan en reacciones químicas (sin catálisis enzimática) entre un reactivo y los péptidos (o proteínas) en la muestra de interés. Los reactivos empleados pueden llevar una combinación diferente de isótopos estables lo que produce un desplazamiento de masa en el espectro MS (como en el marcaje dimetilo) o en el espectro MS/MS (como en el caso de los reactivos isobáricos como el iTRAQ).

Uno de las primeras técnicas de marcaje químico implementadas fue el ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tags* [103]). La marca química ICAT consta de tres partes, un reactivo específico de grupos sulfidrilos que reacciona específicamente con cisteínas, un grupo que permite el aislamiento por afinidad de las especies marcadas, biotina; y una región espaciadora en la que podemos encontrar la distribución isotópica natural (versión

ligera) o una región espaciadora en la que encontramos 8 átomos de deuterio (versión pesada). El mayor inconveniente de esta aproximación es su limitación para marcar péptidos que carezcan de cisteínas y la posible aparición de reacciones secundarias.

Otro método de marcaje basado en el mismo principio es ICPL (*Isotope-Coded Protein Labels*) [104]. Este tipo de marcaje da una ventaja significativa con respecto del ICAT y es que reacciona específicamente con aminas libres, lo que permite que teóricamente todos los péptidos presentes en las muestras puedan ser marcados. En este sentido el marcaje con dimetilo, es una aproximación similar en la que usando dos reactivos simples [105, 106] como formaldehído y cianoborohidruro, se marcan aminas libres (N-terminal y residuos de lisina), permitiendo comparaciones dobles o triples. Esta aproximación es muy fiable y una alternativa barata de cualquier marcaje químico, ya que ofrece unos rendimientos cercanos al 100% con una reacción sencilla.

Un importante grupo de reactivos usados para la cuantificación relativa lo componen los marcajes químicos isobáricos. Estos se basan en el marcaje de los péptidos de diferentes muestras con reactivos con la misma masa molecular por lo que al marcar, los péptidos ganan el mismo incremento de masa. Al ser fragmentados generan diferentes iones reporteros en el espectro MS/MS cada uno de los cuales proviene de una muestra distinta. Uno de los más utilizados es el iTRAQ (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*), comercializado por Applied Biosystems [107], un reactivo compuesto por un grupo reactivo específico de aminas, un grupo balanceador y un grupo reportero. Las diferentes muestras son marcadas después de la digestión enzimática con reactivos que contienen una distribución diferente de isótopos pesados entre el grupo balanceador y grupo reportero, y posteriormente son mezclados. Los péptidos de cada muestra a comparar co-eluyen y son detectados en un único ion precursor. El marcaje iTRAQ está diseñado de tal manera que al fragmentarse los diferentes reactivos generan iones reporteros con la misma composición química, pero diferentes masas moleculares, debido a su composición isotópica diferente. Sus intensidades son proporcionales a las abundancias relativas de los péptidos marcados originarios de las diferentes muestras. Una de las mayores ventajas de este método es la capacidad de "multiplexado" en el que hasta 8 muestras pueden ser analizadas dentro de un único experimento. Una técnica basada en los mismos principios es el marcaje con TMT (*Tandem Mass Tags*) comercializado por Thermo Scientific [108], que permite la comparación de hasta 10 muestras con posibilidad de aplicarlo hasta 18 [109].

Una aproximación diferente para cuantificación a nivel de espectro MS/MS es el IPTL (*Isobaric Peptide Termini Labeling*) [110]. Este método utiliza marcaje isobárico secuencial en los extremos C- y N-terminal de los péptidos analizados con reactivos deuterados o no deuterados. La ventaja fundamental de esta técnica es que la cuantificación utiliza varios

puntos por espectro MS/MS, aunque esto hace que se complique enormemente el análisis de datos.

Una ventaja fundamental de todos los marcajes químicos es que pueden ser aplicados a prácticamente cualquier tipo de muestra (cultivo celular, tejido o fluidos corporales), en contraste con el marcaje metabólico.

Marcaje enzimático

El marcaje isotópico estable puede ser incorporado durante la digestión de las proteínas usando agua pesada (H_2^{18}O) o ligera (H_2^{16}O) en el proceso, incorporando, respectivamente, dos átomos de ^{18}O u ^{16}O en el C-terminal de los péptidos generados, lo que resulta en una variación de masa de 4 Da entre los péptidos ligero y pesado [111, 112]. Este marcaje puede también incorporarse en un paso posterior con una segunda incubación con la proteasa. Este método asegura un marcaje casi completo y carece de reacciones secundarias, pero, a pHs extremadamente ácidos se puede revertir la reacción [113]; sin embargo, las condiciones suaves provocadas durante la ionización ESI, por electrospray; o MALDI, ionización láser asistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), no influyen en la estabilidad del marcaje.

3.1.2. Métodos *label-free*

Los métodos *label-free* se han ido empleando cada vez más en la literatura debido a que conllevan un menor coste y requieren de menos pasos en la preparación de la muestra. La cuantificación libre de marca se basa en la comparación de las diferentes especies peptídicas entre medidas LC-MS o LC-MS/MS. Este tipo de técnicas pueden ser clasificadas en dos categorías generales: (a) métodos que implican la comparación de la intensidad de los péptidos a nivel de análisis LC-MS, y (b) métodos que implican el conteo del número de péptidos identificados o espectros de fragmentación adquiridos.

3.1.2.1. Señal de intensidad de los péptidos

Las señales de intensidad de los iones después de la ionización en electrospray correlacionan con la concentración de los mismos [114, 115]. Por tanto, las áreas de los picos extraídos a partir de los cromatogramas medidos en LC-MS para iones específicos (*eXtracted Ion Chromatograms*, XIC) pueden ser usadas para la cuantificación relativa de péptidos entre diferentes muestras. El método permite medidas con una alta precisión y un gran rango dinámico, especialmente si se utilizan espectrómetros de masas de alta resolución. Sin embargo, hay que tener en cuenta una serie de importantes puntos. El primero, la variabilidad en las intensidades de los péptidos entre diferentes carreras, por lo que para cada muestra debe aplicarse una apropiada normalización. Y secundariamente,

la variabilidad en el tiempo de retención durante la carrera y la variabilidad entre los valores m/z de péptidos idénticos también tiene que tenerse en cuenta. Cualquier variabilidad a este respecto requiere de un alineamiento de los cromatogramas para corregir las cuantificaciones y eliminar cualquier tipo de desvío en el tiempo de retención.

3.1.2.2. Spectral counting

El segundo tipo de cuantificación *label-free* se basa en la observación práctica de que en un método DDA los péptidos más abundantes son más fácilmente detectables. Esta aproximación usa el número de espectros de fragmentación observados o el número de péptidos identificados de una proteína en particular para la cuantificación. Sin embargo, Liu y colaboradores encontraron una correlación lineal entre el número de espectros observados y la abundancia relativa de una proteína, mientras que no encontraron correlación entre la cantidad relativa de proteína y el número de péptidos y la cobertura de secuencia observada [116]. Cabe destacar que el *spectral counting* está limitado por el método de exclusión dinámica aplicado en el método de análisis, si bien, una publicación reciente [117] habla de mejoras en la cuantificación eliminando del método la exclusión dinámica.

3.1.3. Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta es usada para cuantificar la cantidad de masa, número de moléculas o número de copias de una proteína en una mezcla o complejo. Esta técnica es muy informativa, pero, los métodos basados en marcaje son generalmente laboriosos y los métodos *label-free* son menos precisos. La cuantificación absoluta es generalmente realizada a nivel de péptido, aunque recientemente se está introduciendo cada vez más la estrategia *top-down* ('de arriba abajo') [118] que trabaja directamente con la proteína intacta.

Una de las cuantificaciones absolutas más utilizadas es la metodología iBAQ (*Intensity Based Absolute Quantification*) que es una medida normalizada de la intensidad total de cada uno de los escanes de todos los péptidos identificados en una proteína entre el número de péptidos identificables en dicha proteína [82]. El algoritmo puede ser utilizado teóricamente tanto para cuantificación con marcaje como en experimentos *label-free*.

3.1.3.1. Métodos de marcaje isotópico estable

El método más utilizado para cuantificación absoluta AQUA, emplea péptidos marcados con isótopos pesados, péptidos AQUA (marca comercial registrada con ese nombre) para añadirlos como estándar interno [111, 119]. Este método está diseñado

para ser utilizado en una estrategia dirigida por lo que se requiere de información previa de los péptidos y proteínas que se quieran analizar. Como características específicas de los iones precursor *target* (tiempo de elución, m/z , carga), condiciones óptimas de fragmentación (energía de colisión), y patrón de fragmentación determinado previamente. Como los AQUA péptidos se añaden en cantidades conocidas, se puede deducir la cantidad de péptido de interés en la muestra.

Hay varios aspectos críticos que han de ser considerados en un diseño experimental de este tipo, como las digestiones parciales, la cantidad exacta de péptidos AQUA a añadir y el número de péptidos AQUA para cada proteína a cuantificar. Con el objetivo de simplificar todos estos aspectos se pueden usar estándares de péptidos marcados. En este sentido se han desarrollado multitud de técnicas, como el PSAQ (*Protein Standard Absolute Quantification*) [120], SILAC absoluto [121], el FLEXIquant (*Full-Lenght Expressed Stable Isotope-Labeled proteins for Absolute Quantification*) [122]. En todas las aproximaciones basadas en proteína, los estándares son añadidos a las muestras de proteínas y posteriormente son digeridos conjuntamente lo cual genera una mezcla de estándar de péptidos endógenos y marcados.

3.1.3.2. Métodos *label-free*

Esta aproximación para la cuantificación absoluta tiene todas las ventajas e inconvenientes de los métodos *label-free*. Existen multitud de algoritmos empleados para inferir la cantidad absoluta basándose en la relación entre el número de péptidos identificados y entre el número de péptidos teóricamente observables como el emPAI (*exponentially modified PAI* [123]). Otras aproximaciones como el APEX (*Absolute Protein Expression* [124]) están basadas en el conteo de espectro para cuantificar el perfil absoluto de una proteína por célula. Una de las características más importantes del APEX son los factores de corrección que introduce, proporcionando una relación de proporcionalidad directa entre el número observado y esperado de péptidos.

La digestión incompleta es un aspecto fundamental cuando se lleva a cabo la cuantificación absoluta de péptidos o proteínas, para evitar estos sesgos se aplica el método conocido como *Top3* [125]. En esta aproximación la cantidad de los tres péptidos trípticos más abundantes son promediados y utilizados para la cuantificación ya que estarían reflejando la concentración de la proteína.

Indudablemente, todos los métodos aplicados para la cuantificación absoluta pueden ser utilizados para determinar las variaciones relativas de proteínas entre muestras, por comparación de las cantidades absolutas de proteínas de manera relativa.

4. De moléculas a redes

Gran parte de la investigación en biociencias ha estado centrada en entender la compleja relación entre determinado genotipo y el fenotipo observado. Específicamente, la investigación ha abordado cuestiones fundamentales acerca del cómo, cuándo y dónde la información codificada en el genoma de un organismo es expresada y modulada por factores externos (como distintas perturbaciones ambientales) o internos (genómicos como presencia de diversas variantes genéticas) para generar un fenotipo específico. En las últimas décadas, tales estudios han sido desarrollados dentro de un marco teórico clásico en el que se entiende que un gen da lugar a una proteína y esta lleva a cabo una función determinada, “un gen, una proteína, una función”; publicado por primera vez en el trabajo de Beadle y Tatum [126] y que, con las puntualizaciones oportunas de Pauling, Sanger e Ingram, entre otros, contribuyeron a establecer el conocido como “dogma central de la biología molecular”. Este dogma hace dos importantes asunciones que han dominado el pensamiento de la biología experimental (Figura I. 3, A). En primer lugar, se postula una relación directa entre gen y función proteica, lo que implica que el conocimiento de todos los genes y sus productos de traducción puede explicar una función biológica. En segundo lugar, se ordenan las proteínas individuales y sus funciones asociadas en rutas lineales, implicando una relación de causalidad entre las funciones de la ruta.

Desde la publicación de los primeros borradores de genomas completos en febrero de 2001 [37, 127], se han desarrollado multitud de técnicas de biología molecular para apoyar la investigación a escala global pero siempre dentro del paradigma clásico de la biología molecular. Estas incluirían los sistemas de secuenciación para identificar todos los genes codificantes de un genoma [128, 129], los métodos proteómicos para identificar y cuantificar las proteínas en muestras biológicas [65], la ingeniería genómica [130], la eliminación de genes, la tecnología de interferencia de *RNA* [131], y el *screening* de pequeñas moléculas para inhibir o manipular funciones específicas e identificar eventos *downstream* o *upstream* [132]. De manera general, las tecnologías para identificar, cuantificar, mutar e interferir en los niveles de expresión de cualquier tipo de gen o proteína de cualquier especie han sido desarrolladas y han alcanzado un alto nivel de madurez. A pesar de estos avances técnicos y su amplia aplicación, el establecimiento del vínculo entre genotipo y fenotipo sigue siendo un reto en muchos casos. Con la excepción de relativamente pocos defectos en genes únicos que tienen alta penetrabilidad, las bases moleculares de la mayoría de fenotipos de enfermedades resultan ser mucho más complejas y permanecen por determinar [133, 134]. Las razones por las que surgen estas dificultades son más conceptuales que meramente técnicas [87]. El dogma central de la biología molecular centrado en las moléculas basado en rutas unidireccionales, ha

resultado en una visión de la realidad bastante limitada, ya que en cierta medida se han obviado las relaciones contextuales como la intercomunicación entre diferentes rutas [87].

En los últimos 5 años, ha ido emergiendo un nuevo paradigma comúnmente conocido como biología de sistemas, biología de redes o biología integrativa que tiene en cuenta el mayor número posible de relaciones contextuales [135-138] (Figura I. 3, B). Desde el punto de vista de la red, cada nodo representa a una molécula de interés, como un gen, cualquiera de sus productos o molécula pequeña como cofactores, segundos mensajeros y metabolitos. Los hilos entre dos nodos representan una relación, tal como una interacción física, una reacción enzimática, o una conexión funcional. Mientras que el paradigma clásico se centraba en los nodos de la red, el nuevo paradigma se interesa además de en los nodos, en los hilos de la red, de manera que en este caso entre el genotipo y el fenotipo observado se localizarían las redes de interacción. Este nuevo marco conceptual asume que la estructura y topología de las redes son una expresión de la información genómica, que las redes son moduladas dinámicamente a diferentes escalas temporales por perturbaciones internas o externas, y que las propiedades de la red completa son lo que determina realmente el fenotipo.

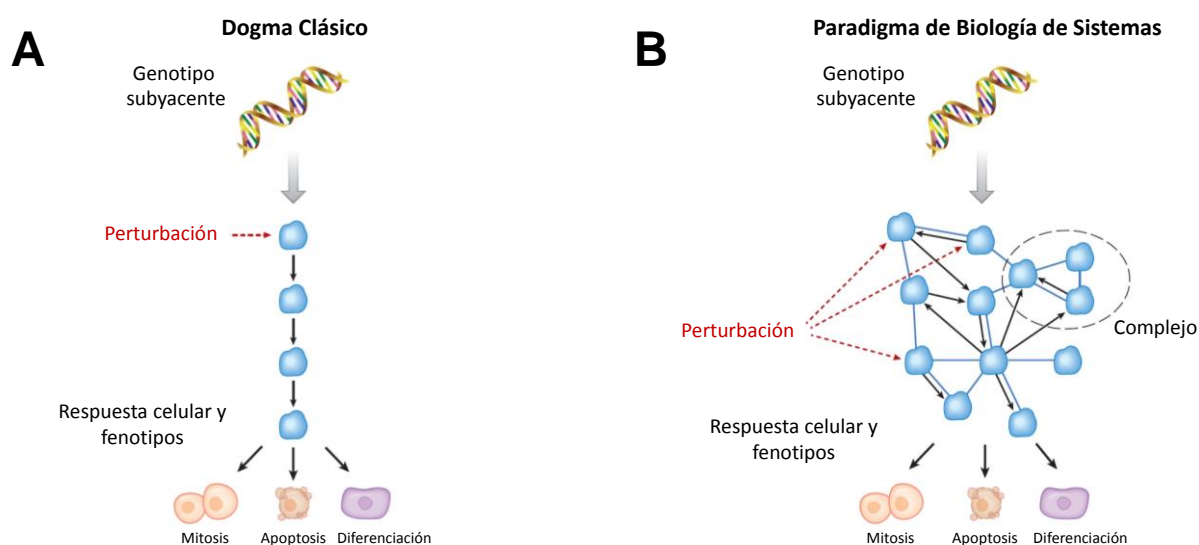


Figura I. 3. Esquemas conceptuales de la biología molecular y celular. (A) Dentro del dogma central de la biología molecular, cada una de las proteínas individuales y sus funciones están ordenados en rutas lineales unidireccionales. **(B)** Dentro del paradigma de biología de sistemas, son las redes de interacción de proteínas lo que se encuentra entre el genotipo y el fenotipo. En ellas, cada nodo (en azul) representa a las moléculas de interés (genes, proteínas o metabolitos). Mientras que los hilos entre los nodos representan cualquier tipo de relación, tales como interacciones proteína-proteína (líneas azules), relaciones enzima-sustrato (flechas negras) o cualquier relación funcional. Modificado de la **Figura 1** de **Mass Spectrometry-Based Proteomics and Network Biology** de Ariel Bensimon y colaboradores, 2012 ([87]).

El nuevo paradigma de biología de sistemas tiene varias implicaciones importantes. Por un lado, requiere una visión diferente mucho más integradora de los diferentes procesos biológicos en la que se tengan en cuenta las relaciones contextuales entre las moléculas que se mueven. En segundo lugar, la biología de sistemas ofrece nuevas

oportunidades conceptuales, pero depende críticamente de nuevas aproximaciones computacionales, incluyendo métodos para visualizar las redes, métodos para inferir la topología y estructuras de las redes, y métodos para simular y modelar los comportamientos dinámicos de redes y sus consecuencias fenotípicas.

4.1. COMPORTAMIENTO DEL PROTEOMA

Los procesos celulares son ejecutados por proteínas trabajando conjuntamente en complejos o rutas funcionales. Sin embargo, en muchos sistemas el modo en el que las células coordinan las proteínas funcionalmente relacionadas es todavía poco conocido. Los recientes avances en proteómica basada en espectrometría de masas permiten la identificación y cuantificación relativa de miles de proteínas en un solo estudio, haciendo de este tipo de técnicas las ideales para el estudio de los procesos biológicos en la escala de "proteoma completo". Pero, a pesar de los avances técnicos de los últimos años, extraer conclusiones biológicas relevantes a partir de la enorme cantidad de datos producidos por los experimentos de proteómica de alto rendimiento aún permanece siendo un desafío.

La interpretación de los datos cuantitativos de otras técnicas de alto rendimiento como la transcriptómica es generalmente hecha teniendo en cuenta el conocimiento biológico almacenado en bases de datos, generalmente referido como "análisis de rutas" [139]. Estas bases de datos de conocimiento pueden contener información ontológica de genes, como *Gene Ontology* (GO) o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), o proporcionar información acerca de interacciones de genes/proteínas y cómo y dónde estas interacciones tienen lugar, como Reactome o STRING. Las herramientas de análisis de rutas que usan información ontológica se han clasificado en dos grandes subtipos: algoritmos de sobre-representación (*Over-Representation*, ORA) y de puntuación de clase funcional (*Functional Class Scoring*, FCS) [139]. El análisis tipo ORA o de enriquecimiento evalúa estadísticamente si dentro de un subconjunto de genes que muestran un cambio de expresión significativo de acuerdo a cierto umbral de corte está enriquecido en determinada categoría u ontología [140, 141]. Aunque esta aproximación se ha usado ampliamente para analizar datos de proteómica cuantitativa, este tipo de algoritmo solo considera proteínas con cambios significativos y por tanto ignora la amplia mayoría de la información cuantitativa adquirida, y además, no tiene en cuenta la abundancia proteica en términos de ratio de cambio, por lo que de una manera estricta este tipo de método no estarían enmarcados dentro de un paradigma de biología de sistemas. En los métodos FCS, los valores cuantitativos de todos los genes de una determinada categoría son integrados para producir un valor cuantitativo a nivel de categoría [139], los cuales son analizados estadísticamente para determinar la significatividad de los cambios de categoría [142-145]. Aunque este tipo de métodos, libres de corte, han sido usados en proteómica y sí tienen en cuenta toda la información cuantitativa obtenida, fueron

originalmente diseñados para tratar datos transcriptómicos, por lo que no tienen en cuenta características específicas de la cuantificación de proteínas por espectrometría de masas. Particularmente, el amplio rango dinámico de concentraciones de proteínas típico de los sistemas biológicos, hace que la cuantificación de proteínas presentes en bajas cantidades sea realmente difícil y en general menos fiable. Este problema se agrava por el alto grado de sobrerrepresentación o subrepresentación, por el cual, el número de péptidos con los que se cuantifica una proteína es variable y no puede ser controlado [146]. Además, los métodos de FCS actuales no están diseñados para analizar la presencia o ausencia de comportamiento coordinado de proteómica en estudios comparativos, un fenómeno evidenciado usando análisis de correlación en publicaciones recientes [147-149].

El concepto de comportamiento coordinado de los genes y proteínas ha sido desarrollado desde diferentes perspectivas experimentales y conceptuales. La primera aproximación al comportamiento de la expresión de genes o proteínas se llevó a cabo mediante análisis de alto rendimiento de mRNA, que han ido revelando que los genes que están funcionalmente asociados con la misma ruta metabólica están generalmente co-expresados [150-152], y que además los transcritos de proteínas de complejos multiproteicos dentro de la misma clase funcional son regulados en la misma dirección [153]. Por otra parte, combinando información de la expresión génica con multitud de datos acerca de interacción de proteínas, fenotipos y unión de factores de transcripción, es posible trazar módulos o grupos de genes que muestran un comportamiento correlacionado [154]. De manera similar, técnicas de fluorescencia han revelado que los niveles de transcritos que son inducidos de manera temporal están altamente correlacionados en levadura [155]. Posteriormente, ya a nivel de proteína, técnicas de citometría de flujo de célula única han sido utilizadas para el estudio del ruido biológico [156], mostrando que proteínas que son subunidades del mismo complejo tienden a tener niveles similares en la célula, que fluctuaciones en los niveles de proteínas tienden a ser menores dentro de complejos grandes [157] y que la variabilidad entre células en los niveles de expresión de proteína son similares para proteínas que comparten funciones similares [158]. Usando una librería de proteínas de fusión en levadura para inmunodetección y medida de la expresión absoluta, Ghaemmaghami y colaboradores [159] por un lado, y Carmi y colaboradores [160] por otro, mostraron que las proteínas que interactúan entre sí tienden a expresarse de manera significativamente más similar en términos de concentración celulares. Finalmente la aplicación de técnicas de MS a escala de proteoma completo ha revelado que las proteínas con funciones similares tienen niveles similares de expresión [161]. De manera análoga, existe un consenso generalizado acerca de que las proteínas funcionalmente relacionadas han de ser reguladas coordinadamente según se ha mostrado por análisis de correlación de abundancia de proteínas después de un fraccionamiento por densidad [162], en experimentos de

evolución temporal [163], o en un largo conjunto de condiciones diversas [164]. A pesar de los esfuerzos, poco se sabe acerca de los mecanismos por los cuales las células coordinan sus niveles de proteínas relacionadas. Además, aunque existen múltiples métodos de análisis cuantitativo obtenidos por métodos proteómicos, no están diseñadas para detectar el comportamiento del proteoma y por tanto para analizar su existencia.

Ninguno de los modelos de análisis funcional existentes permite la detección sistemática y la caracterización del comportamiento coordinado de las proteínas, lo cual es crucial para entender cómo funciona una célula. Aplicando secuencialmente el Algoritmo General de Integración (*General Integration Algorithm*, GIA) construimos el Triángulo de Biología de Sistemas, un flujo de trabajo que lleva a cabo una integración de proteína a categoría, elimina los valores atípicos dentro de cada categoría y detecta los cambios de abundancia significativos producidos por el comportamiento coordinado de sus proteínas [165], y Tesis Doctoral de Marco Trevisan-Herraz. Como prueba de concepto, se detectó coordinación en análisis poco profundos de levadura, fibroblastos y linfocitos murinos, corazones de cerdo y secretomas humanos, por lo que es necesario hacer un análisis análogo en un proteoma mucho más profundo, consistente y del que podamos extraer información biológica relevante.

4.2. PROTEÓMICA DE INTERACCIÓN

Dentro también del paradigma de la biología de sistemas, las tecnologías disponibles para identificar y cuantificar necesitan ser aplicadas para inferir y cuantificar los hilos entre las rutas, es decir, el cableado en el que subyacen las rutas celulares. La primera y más directa aproximación es usar la afinidad entre los diferentes nodos para capturar las moléculas que interactúan y por tanto medir directamente los hilos de la red. Ahí pueden incidir directamente la combinación de tecnologías como la inmunoprecipitación de proteínas utilizando anticuerpos y su posterior análisis mediante espectrometría de masas.

Las redes de interacción proteína - proteína (*Protein-protein interaction networks*, PPINs), han sido uno de los mayores puntos de interés de la proteómica basada en espectrometría de masas, ya que en principio, en estas redes, ambos nodos e hilos que los unen pueden ser directamente medibles. El experimento típico para estudiar tales redes se basa en el uso de bien una proteína o bien otra biomolécula como "molécula cebo" para capturar y aislar proteínas "presa" que interactúan con la primera y posteriormente identificar ambas moléculas mediante MS. Los datos obtenidos gracias a este tipo de aproximación, reflejan de manera bastante cercana la multidireccionalidad y complejidad de las PPINs en la célula. Por tanto, los datos han de ser interpretadas como una red de interacciones proteína-proteína conectadas por múltiples hilos.

5. Estado actual y tendencias en proteómica de VSMC

Los cambios fenotípicos de VSMC son eventos clave en la patogénesis de los diferentes desórdenes vasculares provocados por multitud de factores. Aunque los diferentes estados de diferenciación están en cierta manera caracterizados por la expresión de ciertas proteínas, como α -actina de músculo liso (ACTA2), la cadena pesada de miosina de músculo liso (MYH11), transgelina (TAGLN ó SM22A) y *smoothelin* (SMTN) [166, 167], y se conozcan algunas rutas activadas por los diferentes factores estimulantes, resulta de gran interés el estudio del conjunto de todas las proteínas producidas por dichas células para profundizar en el estudio fenotípico de VSMC. Sin embargo, hasta la fecha, hay un número bastante limitado de estudios que analizan los perfiles proteómicos de las células de músculo liso vascular [168-173] en diferentes modelos animales y humanos y bajo diferentes condiciones de estimulación.

La limitación de estas aproximaciones se debe principalmente a las grandes contrastes en los rangos de expresión de proteínas (amplio rango dinámico) así como las diferencias en el comportamiento de las mismas durante los procesos de separación. Por estas razones, con el objetivo de obtener un análisis proteómico óptimo, es necesario explotar diferentes técnicas de separación en base a múltiples propiedades físico-químicas capaces de reducir la complejidad del proteoma completo. Las técnicas de separación pueden ser divididas en dos grupos principales (1) separación de proteínas completas y (2) separación de los péptidos obtenidos a partir de la digestión enzimática de las proteínas. Todos los artículos publicados en este campo se basan en el primer conjunto, en el que la técnica más empleada es la electroforesis bidimensional (ó 2DGE). 2DGE consiste en la separación de las proteínas en la primera dimensión de acuerdo a su punto isoelectrónico, mediante isoelectroenfoque, seguido de una electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida, para separar las proteínas de acuerdo a su masa molecular [174]. Las proteínas son generalmente visualizadas mediante tinción con azul Coomassie o incluso mediante tinción fluorescente que es más sensible y proporciona mejor rango dinámico.

El primer mapa de proteínas de VSMC fue publicado en 2001 por McGregor y colaboradores [168] y aunque desde entonces se han publicado otros [169, 175-178], el más detallado fue presentado por Mayr y colaboradores en 2005 [179] donde identificaron 235 proteínas, correspondientes a las 154 proteínas más abundantes de células VSMC aisladas de aortas de ratón. En 2008, Gao y colaboradores [173] analizaron los diferentes efectos inducidos en cultivo de VSMC estimulados con AngII y enantiómeros S- y R- de atenolol, analizando una aproximación basada en la identificación de la estructura primaria. Los resultados de este estudio hicieron posible identificar 629 proteínas únicas en ratas. La primera aproximación libre de gel y marcaje fue publicada en 2010

permitiendo identificar 815 proteínas no redundantes de VSMC de cerdo. Esta aproximación combinó extracción en fase sólida diseñada para obtener subproteomas de lisados total con cromatografía líquida de altas prestaciones (*High-performance liquid chromatography* o HPLC) en fase inversa (*reversed phase* o RP) acoplada a un equipo MALDI-TOF-TOF. El último artículo en la literatura sobre VSMC data de 2013 [171], en el que utilizando el mismo equipamiento, obtienen una profundidad de análisis similar. Estos estudios, apoyan el papel de VSMC en la modulación de la matriz extracelular, proceso que podría estar influyendo en la estabilidad de la placa y la trombosis arterial, así como la desregulación del citoesqueleto [180].

Con excepción del trabajo de 2010 de Rocchiccioli, los demás trabajos emplean técnicas clásicas que presentan bastantes limitaciones: (1) la técnica es difícil de automatizar, por lo que es, en general, poco reproducible, (2) no sirve para proteínas muy grandes, que no entran en el gel; ni para proteínas hidrofóbicas como las de membrana; ni para aquellas que tienen pI muy ácidos o muy básicos, ni para proteínas de pequeño tamaño que se puedan espacar del gel con el frente de migración. (3) El rango dinámico de la técnica es muy estrecho, pues no es capaz de detectar proteínas poco abundantes en mezclas complejas. (4) No es adecuada para la identificación sistemática de modificaciones post-traduccionales. Y (5) el equipamiento de espectrometría de masas utilizado por los citados artículos, no presenta las prestaciones suficientes como para tener una visión realmente global de los cambios producidos por determinado estímulo. El último equipamiento del mercado, es capaz de analizar en relativamente poco tiempo de análisis proteomas completos [79, 80].

En el presente trabajo utilizaremos los últimos avances en espectrometría de masas para determinar los cambios dinámicos que se producen en las VSMC, de manera que podamos obtener realmente una imagen global de estas células al activarse bajo estímulo con AngII. Además, gracias a nuestro modelo estadístico, seremos capaces de determinar de qué manera tienen lugar estos cambios.

OBJETIVOS

En la última década la proteómica basada en espectrometría de masas ha sufrido una evolución espectacular. El desarrollo de nuevos equipos de altas prestaciones permite en la actualidad analizar la mayoría de las proteínas de los modelos biológicos. Sin embargo, la interpretación biológica de los resultados obtenidos mediante proteómica es extremadamente compleja debido a la gran cantidad de datos generados. En este sentido, el Laboratorio de Proteómica del CNIC ha desarrollado el Triángulo de Biología de Sistemas (SBT), un nuevo modelo estadístico que podría permitir el análisis sistemático del grado de coordinación de las proteínas, un paradigma central en Biología de Sistemas. No obstante, la utilidad del modelo SBT para el estudio cuantitativo de modelos biológicos no se ha estudiado todavía. Por otro lado, las técnicas convencionales para el estudio del interactoma presentan todavía una serie de limitaciones en términos de profundidad y reproducibilidad de los resultados. Por tanto, se hace necesario el desarrollo de nuevas aproximaciones especialmente diseñadas para el estudio de interacciones proteína-proteína que integren y aprovechen las ventajas de los métodos de proteómica masiva y de los métodos de proteómica dirigida.

El remodelado vascular es un proceso prevalente causante de enfermedades como la hipertensión o el aneurisma y en el que las células del músculo liso vascular parecen desempeñar un papel crucial. Aunque existen múltiples evidencias que implican a la angiotensina II y a la ruta de señalización calcineurina (CN)/NFAT, las rutas de señalización y los mediadores moleculares implicados no se conocen aún en detalle, principalmente durante las fases más tempranas del proceso.

En esta tesis nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Estudiar el fenómeno de la coordinación de proteínas en experimentos de proteómica cuantitativa de alto rendimiento empleando el modelo SBT desarrollado en nuestro laboratorio.
2. Desarrollar un método de análisis proteómico basado en adquisición de datos independiente de intensidad que incluya las prestaciones en cuanto a identificación y cuantificación de proteínas de los métodos masivos y la sensibilidad y reproducibilidad de los métodos dirigidos.
3. Aplicar las tecnologías desarrolladas para caracterizar los cambios dinámicos funcionales producidos por la acción coordinada de las proteínas de músculo liso vascular en respuesta a angiotensina II durante las fases iniciales del remodelado vascular, y para descubrir potenciales mediadores de la ruta de señalización CN/NFAT implicados en este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación de las muestras

1.1. AISLAMIENTO, CULTIVO, ACTIVACIÓN DE VSMC Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

El aislamiento de las VSMC para el cultivo primario se realizó en el Laboratorio del Dr. Juan Miguel Redondo (CNIC) a partir de aortas abdominales y torácicas de ratones silvestres C57BL/6 en las que se raspó la capa de células endoteliales, como describen Ray y colaboradores [181]. Las VSMC se cultivaron en medio DMEM (GIBCO, Invitrogen) con un 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma) suplementado con L-glutamina y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) hasta alcanzar confluencia.

Antes de ser estimuladas, las células se lavaron tres veces con PBS y se dejaron en un periodo de privación de nutrientes, libres de suero, en DMEM. Tras 48 horas las células fueron estimuladas con 1mM de AngII y 0,3 mM CaCl₂, como co-estimulador. Las células control fueron tratadas con DMSO y 0,3 mM de CaCl₂. Todos los cultivos se realizaron a 37°C y 5% de CO₂. Después de 2, 4, 6, 8 y 10 horas, respectivamente, las células de dos placas p100 por cada tratamiento se lisaron usando 500µl de tampón RIPA (NaCl 150 mM, 50 mM Tris pH 8,0, 1% NP-40, 0,5% de desoxicolato sódico, 0,1% SDS) suplementado con 1 mM de DTT, 3 mM EGTA, 1 mM PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas de Sigma-Aldrich (San Luis; MO, USA) (Figura 1.1).

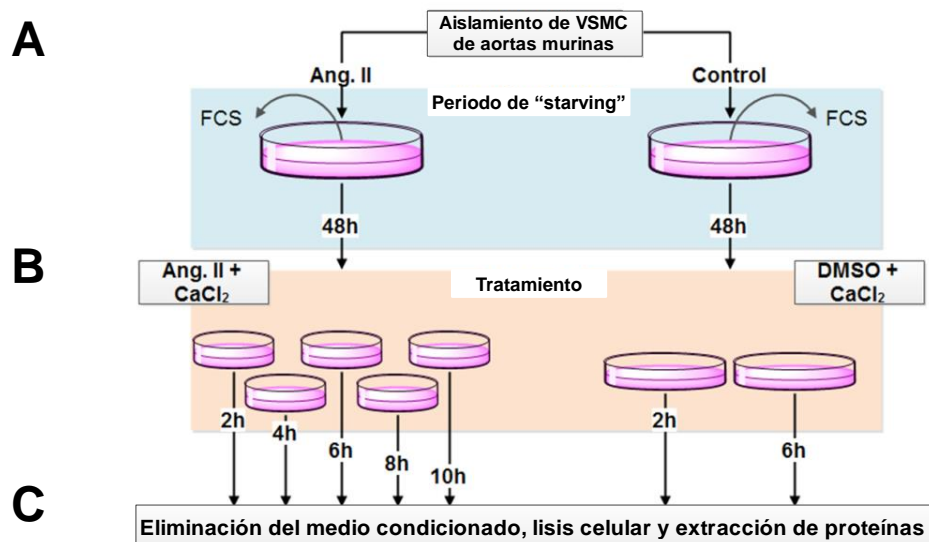


Figura 1.1. Esquema del experimento de efectos de la AngII en el tiempo. (A) Las células de músculo liso vascular (VSMC) confluentes se dejaron 48 h sin suero (periodo de "starving") para sincronizar los cultivos antes del (B) tratamiento a diferentes tiempos con AngII y CaCl₂ como co-estimulador. (C) Eliminación del medio condicionado, lisis celular y extracción de proteínas para el procesamiento posterior.

La viabilidad celular se determinó visualmente con un microscopio óptico y la identidad de las células aisladas fue confirmada como VSMC usando un anticuerpo anti-actina de músculo liso [182].

1.2. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS CEREBRAL Y VASCULAR, ACTIVACIÓN DE VSMC EN EXPLANTES DE SEGMENTOS DE AORTA Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Los cerebros y segmentos de arterias aortas abdominales y torácicas fueron extraídos en el Laboratorio del Dr. Juan Miguel Redondo a partir de ratones C57BL/6 silvestres (WT) y *Rcan1*^{-/-} (KO) previamente descritos por Porta y colaboradores en 2007 [183]. Para ello, las isoformas de *Rcan1* (RCAN1.1 y RCAN1.4) fueron eliminadas de manera constitutiva mediante la interrupción del exón 6 del gen, que es común a ambas isoformas (Figura 1.2).

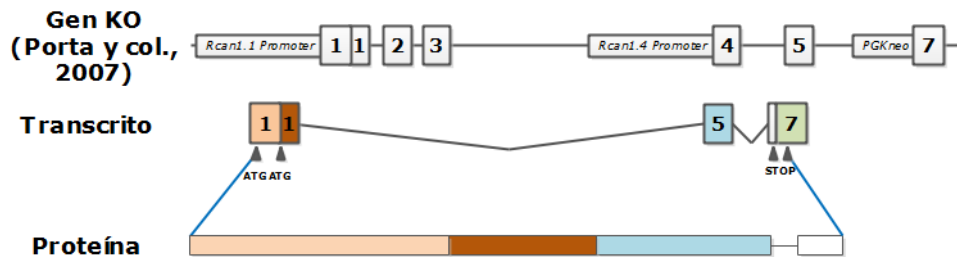


Figura 1.2. Estructura génica de los ratones transgénicos *Rcan1*^{-/-}. En la parte superior, se muestra el resultado de la recombinación producida en el gen de *Rcan1*, publicada por Porta y colaboradores en 2007 [102]. Y en la parte inferior, se muestra el transcrito resultante.

Todos los ratones se mantuvieron en las instalaciones del CNIC en un ambiente libre de patógenos, con ciclos de luz-oscuridad, temperatura y humedad regulados según la legislación europea para la protección de animales con propósitos científicos (EU *Directive* 2010/63EU).

Anillos de aortas abdominales y torácicas de ratones C57BL/6 WT y *Rcan1*^{-/-} de 2 mm aproximadamente de grosor se lavaron tres veces con PBS y se dejaron en medio DMEM (GIBCO, Invitrogen) sin suero suplementado con L-glutamina y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin). Tras 48 h las arterias fueron estimuladas durante 1,5 h con 1 mM de AngII y 0,3 mM CaCl₂, como co-estimulador o con DMSO y 0,3 mM de CaCl₂ en las muestras control de tratamiento. Todos los cultivos se crecieron a 37°C y 5% de CO₂.

La extracción de proteínas de cerebro, así como la extracción de proteínas a partir de los anillos de aorta, tanto de ratones WT como KO para *Rcan1*, estimulados y sin estimular con AngII, se llevó a cabo durante 30 min a temperatura ambiente (RT) con 1 ml de buffer RIPA suplementado con 5% de glicerol, 1% de benzonasa, 1 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂), inhibidores de fosfatasas (1 mM ortovenadato sódico, 5 mM de

fluoruro sódico y 1 mM de beta-glicerofosfato) e inhibidores de acetilasas (10 mM de butirato sódico), con el fin de asegurar el mantenimiento de las interacciones proteína-proteína que se ven favorecidas por sendas modificaciones post-traduccionales.

La concentración de todos los extractos de proteína se determinó mediante ensayo Lowry utilizando BSA como estándar.

1.3. DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS DE INTERACTÓMICA DE RCAN1

Como prueba de concepto, para poner a punto la detección de proteínas que interaccionan específicamente con *Rcan1*, en el Laboratorio del Dr. Juan Miguel Redondo se hizo un ensayo de inmunoprecipitación de RCAN1 a partir del extracto cuantificado de proteína cerebral de ratones C57BL/6 WT y *Rcan1*^{-/-} (KO), puesto que es un tejido con una expresión extremadamente abundante de la propia RCAN1 [184, 185]. Y finalmente, se aplicó el mismo protocolo que se describe a continuación con la misma concentración de proteína de partida para estudiar el interactoma en condiciones de activación en células de músculo liso en anillos de aortas.

Los extractos proteicos obtenidos tras la lisis, se incubaron durante 60 min con 50 μ l de microesferas magnéticas conjugadas con proteína G de estreptococo que carece de la región de unión específica a albúmina de suero (G-dynabeads) (Invitrogen, Waltham; MA, USA) a 4°C. El sobrenadante clarificado se recuperó mediante centrifugación a 4000g durante 15 min.

En paralelo se preparó el conjugado microesfera magnética anticuerpo específico frente a RCAN1 que reconoce al péptido PVINYDLLYAISKLGPGKEYELHAATDTTPSVVVHVCESDQKEEEEEEME, común a ambas isoformas (RCAN1.1 y RCAN1.4) y que se encuentra codificado por parte del exón 6 y parte del exón 7 (G-dynabeads- α -RCAN), para lo cual se lavaron 200 μ l de proteína G-dynabeads 2 veces con 1 ml de buffer de lisis (descrito en el apartado anterior), se resuspendieron en el doble de volumen de partida y la mitad de las bolitas se incubaron durante toda la noche a 4°C con 5 μ g de anticuerpo de ratón α -RCAN1. Finalmente, se lavaron dos veces con 0,5 ml del mismo buffer de lisis, generándose un stock de bolitas conjugadas con y sin anticuerpo que se emplearon para inmunoprecipitar las proteínas en las muestras KO y WT.

Una vez preparado el conjugado G-dynabeads- α -RCAN1, se incubó con el extracto de proteína clarificado, durante 1 h a 4°C. Posteriormente, las bolitas se lavaron tres veces mediante centrifugación a 4000 g durante 15 min con 200 μ l del mismo buffer de lisis, pero con una concentración inferior de NP-40 (0,5%) y cinco veces más con el mismo buffer de lisis sin detergente, para finalmente, resuspenderlas en buffer Laemmli 1x antes de aplicar al gel de electroforesis y digerirlas en gel concentrante como se detalla a continuación. Todo este análisis se realizó por triplicado.

1.4. DIGESTIÓN DEL PROTEOMA COMPLETO EN GEL CONCENTRANTE, MARCAJE ISOTÓPICO DE PÉPTIDOS MEDIANTE ITRAQ 8PLEX Y FRACCIONAMIENTO DE PÉPTIDOS POR INTERCAMBIO CATIÓNICO

Los siguientes pasos del protocolo se hicieron siguiendo las instrucciones previamente descritas en nuestro protocolo robusto, publicado por Bonzon-Kulichenko y colaboradores [186] con alguna modificación (Figura 1.3). Brevemente, se digirieron 450 µg de proteína de las muestras control y tratadas para cada uno de los tiempos y se cargaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) hasta que el frente de la carrera electroforética alcanzó el gel separador, de manera que el proteoma completo se concentra en el gel concentrador. Una vez teñido con azul Coomassie, la banda única del proteoma completo para cada carril se cortó en cubos (0,5 cm²). Los trozos de gel para cada muestra fueron puestos en un tubo y digeridos durante la noche de 37°C [187] con 60 ng/µl de tripsina (Promega, Madison; WI, USA) a una proporción 10:1 (proteína:tripsina) en peso en 500 mM de tampón bicarbonato amónico pH 8,8 con 10% (v:v) de acetonitrilo (ACN) [188]. Los péptidos tripticos resultantes para cada muestra fueron extraídos mediante incubación de 1 h en 12 mM de tampón bicarbonato amónico (ABC) a pH 8,8, seguido de una incubación de 1 h en ACN/12 mM de tampón ABC pH 8,8 (2:1) (v:v). Posteriormente, se añadió ácido trifluoroacético (TFA) 25% para alcanzar una concentración final de 1% a cada una de las muestras, para desalarlas mediante cartuchos de extracción C18 OASIS HLB (Waters, Milford; MA, USA). Finalmente los péptidos se secaron en centrífuga de vacío.

Los péptidos de cada uno de los tiempos de tratamiento fueron diferencialmente marcados con las etiquetas isobáricas del iTRAQ 8plex. El marcaje fue realizado esencialmente de acuerdo con las instrucciones de fabricante. Resumidamente, los péptidos se disolvieron en 30 µl de tampón de disolución iTRAQ proporcionado con el kit (Applied Biosystems, Foster City; CA, USA) y marcados añadiendo 70 µl del reactivo iTRAQ correspondiente e incubando durante 1 h a temperatura ambiente en 70% isopropanol, 180 mM bicarbonato trietilamónico (TEAB), pH 8,5. La muestra control 2 h fue marcada con la etiqueta 113, la muestra 2 h tratada con AngII fue marcada con la etiqueta 114, la muestra 4 h tratada con AngII fue marcada con la etiqueta 115, la muestra 6 h tratada con AngII fue marcada con la etiqueta 116, la muestra control 6h tratada con AngII fue marcada con la etiqueta 117, la muestra 8 h tratada con AngII fue marcada con la etiqueta 118 y la muestra 10 h tratada con AngII fue marcada con la etiqueta 119. La reacción química de marcaje se paró añadiendo 200 µl de ácido fórmico (FA) 0,1% (v:v) durante 30 min y llevando a sequedad para detener completamente la reacción de marcaje. La extinción de la reacción se repite para promover la volatilización del TEAB. Posteriormente,

las siete muestras marcadas fueron redisueltas en 200 μ l de FA 0,1% y mezcladas en un tubo nuevo. La mezcla de péptidos se desaló en un cartucho de extracción C18 OASIS usando una solución de elución de 50% ACN en TFA 0,1% y se secaron a vacío. Los péptidos limpios fueron después separados en 6 fracciones de intercambio catiónico fuerte usando un cartucho de MCX OASIS (Waters, Milford; MA, USA). Las soluciones de elución empleadas fueron: (1) 500 mM de formiato amónico pH 3 en 25% ACN (v:v), (2) 1 M formiato amónico pH3 en 25% ACN (v:v), (3) 1,5 M de formiato amónico pH 3 en 25% ACN (v:v), (4) 500 mM de formiato amónico pH 3 en 1,5 M de cloruro potásico y 25% ACN (v:v), (5) 1,25 M de formiato amónico pH 3 en 37,5% ACN (v:v) y (6) 1 M de formiato amónico pH 3 en 50% ACN (v:v). Las fracciones se secaron en centrífuga de vacío y se disolvieron en 500 μ l de TFA 1% para ser posteriormente desaladas en cartuchos de C18 OASIS HLB, usando una solución de 50% ACN en 0,1% TFA para eluir los péptidos. Las muestras se secaron antes del análisis de cromatografía líquida en fase inversa acoplada al espectrómetro de masas (RP-HPLC-MS).

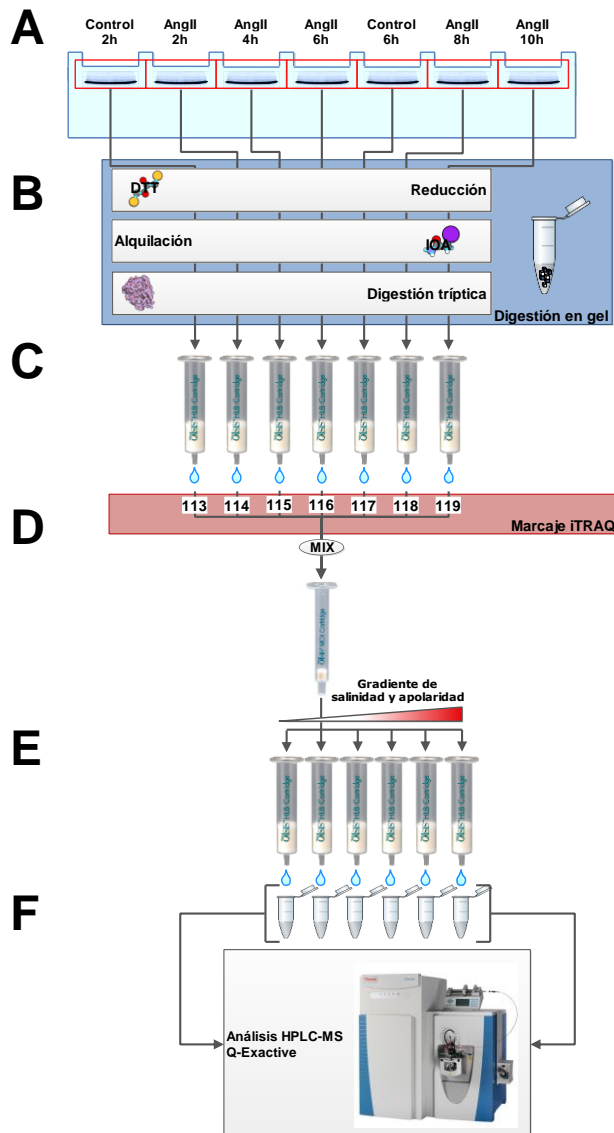


Figura 1.3. Protocolo de análisis proteómico. (A) Las proteínas extraídas de cada una de las muestras se concentran en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). (B) Una vez troceado el gel se produce la reducción y alquilación de las proteínas, así como la digestión triptica de las mismas. (C) Los péptidos tripticos se desalan para eliminar la disolución de digestión y preparar para (D) marcaje isobárico iTRAQ 8plex. (E) Fraccionamiento de los péptidos marcados mediante intercambio catiónico. (F) Análisis de los péptidos marcados y desalados mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplada a espectrometría de masas en Q-Exactivo.

2. Análisis mediante LC-MS/MS e identificación de péptidos

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida (LC) usando un nano-HPLC (EASY-nLC II, Thermo, Waltham; MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas Q-Exactive (Thermo-Finningan, San Jose; CA, USA). Los péptidos se cargaron en una columna cromatográfica de 50 cm de longitud equilibrada en tampón A (FA 0,1% (v:v)) a un flujo de 200 nl/min y se eluyeron en un gradiente lineal de 8 a 40% de tampón B (90% ACN, FA 0,1% (v:v)) durante 480 min para los experimentos de expresión diferencial y 240 min para los experimentos de interactómica.

2.1. MÉTODO DE ADQUISICIÓN DE DATOS DEPENDIENTE DE INTENSIDAD (DdS O DDA)

El método de adquisición dependiente de intensidad (*Data-dependent Scanning* o *Acquisition*, DdS o DDA) de espectrometría de masas, utilizado en los experimentos de expresión diferencial, consiste en un barrido de iones parentales en el analizador de alta resolución *Orbitrap* en un rango de masas (m/z) de entre 390 y 1.500 Th (*full scan*). Para ello, usando 1 microscan, se fija un valor objetivo de iones acumulados (*Automatic Gain Control*, AGC) de $1 \cdot 10^6$ iones o un tiempo máximo de inyección para conseguir ese AGC de 60 ms a 35.000 de resolución (FWHM) (*Full Width at Half Maximum*, anchura del pico a la mitad de la altura máxima). Los 20 iones más intensos detectados en este primer barrido son secuencialmente aislados y posteriormente fragmentados (espectros MS/MS) mediante disociación inducida por colisión de alta energía (*Higher-energy Collisinal Dissociation*, HCD) en la celda de colisión HCD usando valores objetivos de 50.000 iones u 80 ms de tiempo máximo de inyección iónica, con una energía de colisión normalizada del 30%. Los fragmentos generados en el espectro MS/MS son detectados en el analizador *Orbitrap* con una resolución de 17.500 FWHM. Los parámetros de exclusión dinámica se fijan en 1 repetición durante 60 s, con un error de masa de ± 5 ppm y la ventana de aislamiento del precursor en el cuadrupolo se fija en una anchura de 1,5 Th.

Por otro lado, y con el objetivo de comparar el DDA con el modo de adquisición independiente de intensidad (DIA o DiS, ver epígrafe siguiente), se diseñaron 2 métodos de DDA adicionales, en los cuales el análisis LC-MS/MS se adquirió en dos rangos de masa de 400 a 750 Th y de 750 a 1100 Th, respectivamente. En ambos métodos la ventana de aislamiento del precursor en el cuadrupolo para el MS/MS se fijó en una anchura de 2 Th, mientras que el resto de los parámetros tanto para el *full scan*, como para el MS/MS fueron los mismos que los descritos en el párrafo anterior (Figura 2.1, A).

2.2. MÉTODO DE ADQUISICIÓN DE DATOS INDEPENDIENTE DE INTENSIDAD (DiS O DIA)

El método de adquisición independiente de intensidad (*Data-independent Scanning* o *Acquisition*, DiS o DIA) de espectrometría de masas, utilizado en este trabajo, principalmente en los experimentos de interactómica de RCAN1; se basa en la adquisición en dos rangos de masas, uno de entre 400 y 750 Th y otro de entre 750 y 1100 Th, en los que secuencialmente se fragmenta todo el intervalo en ventanas deslizantes de precursores de una anchura de 2 Th aislados en el cuadrupolo. Las fragmentaciones inducidas se realizaron en la cámara HCD y finalmente fueron adquiridas en el analizador *Orbitrap* a 17.500 de resolución buscando unos valores objetivo de $2 \cdot 10^5$ iones u 80 ms de tiempo máximo de inyección de los mismos con una energía de colisión normalizada del 27% (Figura 2.1, B). Para cada rango de masas se optimizaron todos los parámetros de voltajes de la óptica del espectrómetro con el fin de poder medir con alta sensibilidad todas las especies que coeluyen en la misma ventana deslizante.

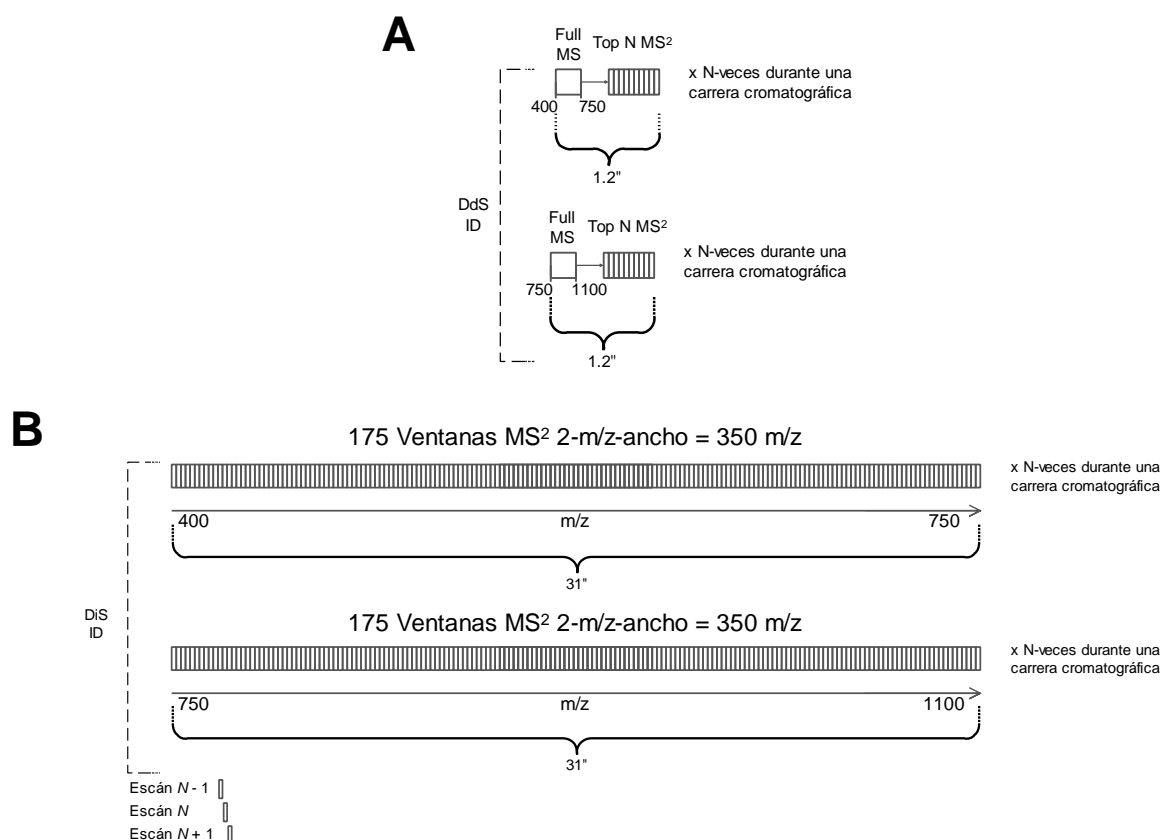


Figura 2.1. Modos de análisis mediante espectrometría de masas *shotgun*. (A) Modo adquisición de datos dependiente de intensidad (DdS ID). **(B)** Modo de adquisición de datos independiente de intensidad (DiS ID).

2.3. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS A PARTIR DE DATOS PROCEDENTES DE DDS Y DiS

La identificación de las proteínas se realizó tal y como describen Lopez-Ferrer y colaboradores [189] usando el algoritmo SEQUEST HT del Proteome Discoverer 1.4 (Thermo-Finningan, San Jose; CA, USA), para los datos procedentes de adquisición DdS y mediante algoritmo SEQUEST convencional para datos procedentes de adquisición DiS y los análogos DdS para que fueran comparables. Los archivos de datos crudos de espectros de fragmentación fueron buscados contra una base de datos del proteoma de referencia de la especie cuya muestra se estaba analizando: Proteoma ratón de referencia (Uniprot, publicada el 28 de abril de 2012), Proteoma de *E. coli* de referencia (Uniprot, publicada el 14 de Junio de 2012) y proteoma humano de referencia (Uniprot, publicada el 2 de Noviembre de 2011), estas últimas se utilizaron durante la puesta a punto del cálculo de la tasa de error para el método DiS. La misma colección de espectros MS/MS fue buscada de forma separada frente a una base de datos señuelo pseudoinvertida, construida a partir de la respectiva base de datos referencia mediante un programa escrito en el laboratorio (MaesePedro 0.03). Tanto para el DdS, como para el DiS, las búsquedas de SEQUEST fueron realizadas permitiendo opcionalmente la oxidación de metionina así como la modificación fija de la cisteína carbamidometilada y la modificación iTRAQ 8plex en N-terminal y lisina, en los experimentos de cuantificación diferencial; se permitieron 2 cortes no producidos en residuos diana de tripsina, dejando una tolerancia de masa de 2 Da y 30 ppm, para el precursor y los iones fragmentos, respectivamente. En el método DdS se permitió la fragmentación de iones de carga +2 hasta +4, determinadas de manera automática por el espectrómetro. Sin embargo, en el caso del DiS, al no existir información sobre el precursor, se realizaron tres búsquedas independientes fijando la carga del precursor en +2, +3 o +4, obteniendo una puntuación para cada posible precursor, en un único archivo de salida (.msf) que es generado por el propio Proteome Discoverer.

En el DdS, el cálculo de la tasa de falsos descubrimientos (*False Discovery Rate*, FDR), como medida de la confianza estadística de la identificación peptídica, se realizó mediante el método refinado para el cálculo de la FDR [190] usando el cociente de probabilidad de cada espectro (*probability Ratio*, pRatio) [191] filtrando con una tolerancia de precursor estrecha (15 ppm) después de la búsqueda [192].

En el caso del DiS, se realizó el cálculo de la FDR de manera convencional, usando para el orden del ranking de la lista de resultados de la búsqueda directa e invertida unidas; un parámetro compuesto en el que dimos igual peso (50:50) a la puntuación dada por el *SpScore* y el *XCorr* corregido, este último, tal y como lo calculamos en el artículo de Navarro y colaboradores [190] (Ecuación 1). Resumidamente, ambas puntuaciones se realizan dentro del motor de búsqueda SEQUEST; el *Xcorr* por su parte, es una medida

normalizada de la correlación entre los espectros de fragmentación experimentales y teóricos. Mientras, que el *SpScore*, es una puntuación análoga que se calcula de manera intermedia pero que además tiene en cuenta el grado de correlación en intensidad entre ambos espectros. Estas consideraciones están implementadas en un nuevo software al que llamamos DXtractor.

$$DiS\ Score = 0,5 \cdot SpScore + 0,5 \cdot \frac{\log_{10} \frac{XCorr}{z_m}}{\log_{10} l} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde z_m , es 1,2 si $z > 2$ y 1 si $z = 1$; y l , el número de aminoácidos del péptido.

3. Proteómica cuantitativa y análisis estadístico

La cuantificación de los péptidos se hace en los correspondientes espectros de fragmentación a partir de la intensidad de los iones reporteros dentro de una ventana de 0,4 Da alrededor de los valores teóricos. Las intensidades de los reporteros además son corregidas en función de la pureza isotópica, facilitada por el fabricante, teniendo en cuenta el solapamiento de las envolturas isotópicas entre los iones vecinos (Figura 3.1). Todos estos aspectos, se tienen en cuenta en la cuantificación del \log_2 ratio para cada espectro de manera binaria utilizando QuiXoT, un programa desarrollado en el laboratorio escrito en C#.

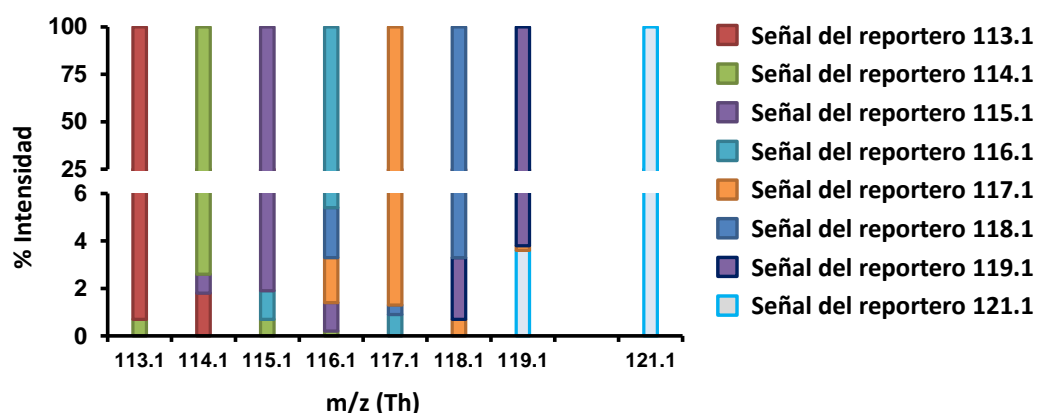


Figura 3.1. Influencia de los iones reporteros en la señal de los reporteros vecinos. Se muestra en diferentes colores el porcentaje de intensidad que de la señal con la que los iones reporteros influyen en los adyacentes.

El análisis estadístico de los datos cuantitativos se realizó sobre la base del modelo estadístico desarrollado en nuestro laboratorio (*Weighted Scan Peptide and Protein*, WSPP) [63, 193], y se llevó a cabo de forma automática mediante el uso de un flujo de trabajo en formato CMD batch que incluye una serie de programas desarrollados en el laboratorio escritos en Python, como *Klibrate*, *SanXot* y *SanXotSieve* (Tesis Doctoral de Marco Trevisan-Herraz). En Anexos se presenta un esquema del flujo de trabajo, el significado de los distintos parámetros del algoritmo general de integración (*General Integration Algorithm*, GIA) y del Triángulo de Biología de Sistemas (*Systems Biology Triangle*, SBT),

así como el propio flujo de trabajo empleado para el análisis (Figura Suplementaria 1 y Material Suplementario 1, respectivamente).

Resumidamente, el \log_2 ratio de la concentración de las dos muestras que están siendo comparadas, A y B, determinadas por el espectro s y el péptido p derivado de la proteína q en el experimento e se expresa como $X_{eqps} = \log_2 (A/B)$. El valor de \log_2 -ratio asociado a cada péptido, X_{eqp} , es calculado como la media ponderada de los espectros utilizados para la cuantificación del péptido, y el valor asociado a cada proteína, X_{eq} , equivale a la media ponderada de cada péptido que la compone. Además, se calcula la media global, X_e , para cada experimento como la media ponderada de los valores de todas las proteínas. Los pesos estadísticos en todos los casos son las inversas de las varianzas locales para cada uno de los valores de espectro, péptido y proteína. Todas estas integraciones de la información cuantitativa de un nivel inferior a un nivel superior (como por ejemplo de espectro a péptido), al igual que el cálculo de la varianza global de los elementos del nivel inferior con respecto al nivel superior (por ejemplo la varianza de los espectros con respecto a sus péptidos cuando se integra de espectro a péptido) se realizan de forma secuencial mediante el algoritmo GIA implementado en el programa *SanXot* del flujo de trabajo. Dicho algoritmo también calcula la varianza constante incluida en la varianza global del nivel inferior (por ejemplo de péptido a proteína sería la σ^2_p). En el caso de la primera integración de la información cuantitativa dentro del flujo de trabajo, la varianza local de cada elemento del nivel inferior (como la varianza local de espectro en la integración de espectro a péptido) es modelada como una función hiperbólica de la intensidad de la señal cuantitativa medida usando dos parámetros fijos, k_e y la varianza constante (que para el espectro sería σ^2_s). De manera simplificada, se toma el valor máximo de la pareja de señales que se están comparando y se calibra de acuerdo a la desviación cuadrática media entre la curva teórica que se ajusta a la comentada función hiperbólica y los datos experimentales. Este ajuste se hace de manera automática de acuerdo con el algoritmo Levenberg-Marquardt dentro del software *Klibrate* implementado en el flujo de trabajo de análisis estadístico. *SanXot* también devuelve una lista de las variables del nivel inferior estandarizadas, Z , que expresa los valores cuantitativos en unidades de desviación estándar alrededor de la media del nivel superior, en la que se considera que la hipótesis nula sigue una distribución normal $N(0, 1)$. El software, *SanXotSieve* detecta los valores atípicos (*outliers*) del nivel inferior a partir de los valores Z , usando un umbral de corte de la tasa de error (FDR del nivel correspondiente) al 1%, y los elimina del set de datos antes de proceder a la siguiente integración. En la integración de proteína a media global los *outliers* se detectan al 5% FDR_{qa}, pero no son eliminados, porque constituyen los cambios significativos de abundancia de proteína.

3.1. CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE PROTEÍNAS BASADA EN INTENSIDAD

La señal MS de cada proteína se puede utilizar para estimar la abundancia celular absoluta de las mismas [1-3]. Para calcularla aplicamos el algoritmo iBAQ [4], en el que se normaliza el sumatorio de las intensidades de cada proteína por el número de péptidos teóricamente observables de cada proteína (Ecuación 2).

$$iBAQ = \frac{\sum_{p_1}^{p_n} I}{NPO} \text{ (Ecuación 2)}$$

donde NPO, es el número de péptidos observables de la proteína q, y p_1 hasta p_n son todos los péptidos de la proteína q e I la intensidad absoluta de la señal del reportero correspondiente al tiempo estudiado

Por un lado, QuiXot es capaz de calcular las intensidades de las proteínas como la suma de las intensidades de los péptidos que las componen, sumando cada una de las intensidades del reportero correspondiente en cada uno de los escanes en los que se han identificado dichos péptidos. Y el número de péptidos teóricamente observables se calculó mediante digestión *in silico* completa de péptidos entre 6 y 30 aminoácidos de la base de datos de proteínas con la que se realizó la identificación. Las intensidades iBAQ resultantes fueron transformadas a log en base 10.

3.1.1. Cálculo del número de copias por célula

Finalmente, el número de copias por célula lo calculamos a partir de la contribución general de cada proteína al total de señal del proteoma en su conjunto conociendo la masa de proteica de una única célula, las cuales están publicadas y tabuladas en [5]; aplicando (Ecuación 3):

$$\text{Número de copias por célula} = \frac{\sum \text{Señal MS proteína A}}{\text{Señal total MS}} \cdot \frac{N_A}{M} \cdot M_C \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde N_A es el número de Avogadro, M es la masa molecular de la proteína y M_C , la masa proteica celular.

La tendencia de la población general de proteína o de subpoblaciones de las mismas fue calculada mediante regresión lineal de los valores de número de copias por célula usando todas las proteínas del estudio ($N=10.554$) o aquellas que son de un tipo determinado.

4. Análisis mediante biología de sistemas

4.1. EL TRIÁNGULO DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS (SBT)

La mayoría de los experimentos de proteómica intentan explicar los efectos de un estímulo sobre una muestra biológica a través de cambios en proteínas individuales. Sin embargo, con el objetivo de tener una visión biológica global de dicho efecto realizamos

un análisis de biología de sistemas, cuyos detalles se encuentran en la Tesis Doctoral de Marco Trevisán-Herraz y en el artículo [194]. Dicho análisis se realizó sobre la base del modelo estadístico WSPP [63, 193] de forma automática mediante un flujo de trabajo en formato CMD batch y empleando los mismos programas descritos en el apartado anterior, así como otros que iremos comentando a continuación. El significado de los distintos parámetros del modelo WSPP que se mencionarán en este apartado, así como el flujo de trabajo empleado se puede encontrar en Material Suplementario (Material Suplementario 1).

Brevemente, mediante el uso del *SanXot*, la información cuantitativa a nivel de proteína se integró al de categoría funcional (incluyendo en estas cualquier forma general de clasificación de proteínas, ya sean funciones biológicas, componentes celulares, rutas o redes de interacción), asumiendo que durante la perturbación de un sistema biológico todas las proteínas pertenecientes a una clase funcional sufren exactamente el mismo cambio de abundancia. Para esta clasificación se emplearon 14 bases de datos oficiales con información ontológica como son los repositorios de Ingenuity Pathways [195, 196], DAVID [84] y la base de datos de complejos proteicos curados CORUM [197]. Posteriormente, mediante *SanXotSieve*, se detectaron de forma automática las proteínas con valores atípicos que se desviaban del supuesto comportamiento al unísono del resto de proteínas pertenecientes a la misma categoría, y se eliminaron antes de la siguiente integración de proteína a categoría. Finalmente, se lleva a cabo la integración categoría a media global, cerrando así lo que denominamos SBT (Figura 4.1). En esta última integración, los valores atípicos ($FDR_{ca} < 5\%$) indican las categorías que debido a la perturbación del sistema biológico cambian de abundancia como consecuencia del comportamiento coordinado de sus proteínas.

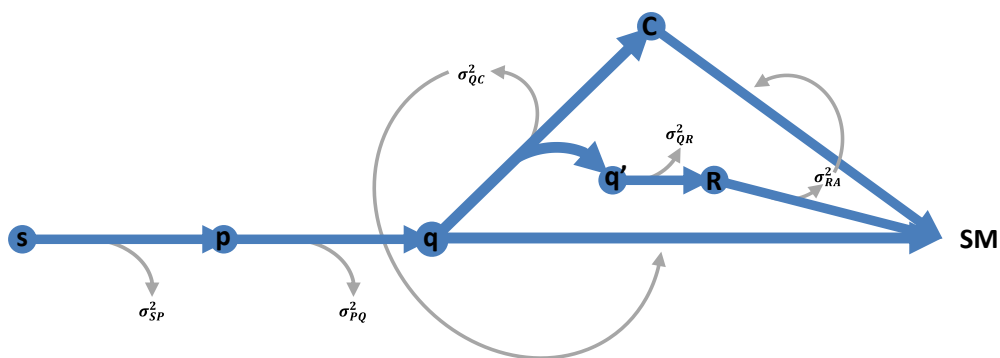


Figura 4.1. Representación esquemática del modelo estadístico unificado. Se muestran los diferentes pasos del GIA en el que los espectros (**s**) son integrados a péptidos (**p**) y estos los son a su vez a proteína (**q**) estimando por el camino la varianza a los diferentes niveles (σ^2_{sp}) y (σ^2_{pq}), respectivamente. En la integración proteína a categoría (**C**) se calcula el error experimental (σ^2_{qc}) el cual es aplicado a la integración proteína a media global (**SM**). La estimación de la variabilidad debido al estímulo biológico es finalmente estimada integrando de categoría a media global. Para llevar a cabo este último paso, es necesario la aplicación de una nueva varianza (σ^2_{ra}) estimada a partir de las cuantificaciones de proteínas sin valores atípicos (**q'**) realizando N randomizaciones de la clasificación de proteínas, en las que se calcula (σ^2_{qr}) y N randomizaciones de categorías randomizadas a la media global del experimento (ver detalles del modelo en la Tesis Doctoral de Marco Trevisan-Herraz y en el artículo [194]).

4.2. ESTIMACIÓN DE LA COORDINACIÓN DEL PROTEOMA

Al eliminar los valores atípicos de la integración proteína a categoría se aseguró que los cambios de abundancia de las proteínas que se mantienen en cada categoría no se desvían significativamente de la media de la categoría. A proteínas de este tipo las definimos como proteínas con un comportamiento coordinado y las categorías resultantes como homogéneas. De esta manera definimos como, porcentaje de coordinación como la fracción de cambios coordinados del total de cambios producidos por el estímulo biológico (Figura 4.2) (ver más detalles en la Tesis Doctoral de Marco Trevisán-Herraz y en el artículo [194]). Las categorías homogéneas que cambian de forma significativa y que tienen más de 5 proteínas por categoría son seleccionadas de forma automática por otro programa del paquete *SanXotSqueezer*. Posteriormente, las distribuciones de proteínas de dichas categorías son representadas mediante el programa *SanXotGauss*, tal y como se observa en la Figura 4.2.

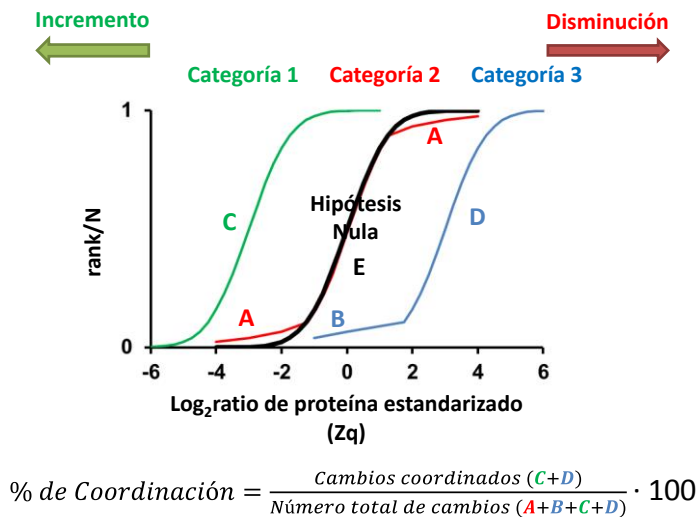


Figura 4.2. Definición del porcentaje de coordinación de un proteoma. Se define el porcentaje de coordinación como el número de proteínas pertenecientes a categorías cuyo cambio de abundancia sea de manera coordinada (aumenten o disminuyan), con presencia o no de valores atípicos (C) y (D), respectivamente. Entre el total de cambios en los que además de los anteriores, tenemos proteínas que cambian por sí mismas (A) y valores atípicos de categorías que cambian (B).

4.3. SIMPLIFICACIÓN DE LAS CATEGORÍA CON INFORMACIÓN REDUNDANTE

Con el objetivo de ser lo más exhaustivo posible en la clasificación funcional de las proteínas, recuperamos la información contenida en más de 14 bases de datos accediendo a los repositorios de *Ingenuity Pathways* [195, 196], *DAVID* [84] y la base de datos de complejos proteicos curados *CORUM* [197]. Como consecuencia, por un lado, en múltiples ocasiones una misma proteína se clasifica en más de una categoría funcional, lo cual es también un reflejo de la realidad biológica; y por otro lado, varias categorías pueden compartir o incluso contener las mismas proteínas, aunque el nombre de la categoría funcional sea diferente. Para simplificar el análisis en la medida de lo posible y extraer la información mínima necesaria para la interpretación de los resultados de biología de sistemas, en el flujo de trabajo automático utilizamos el programa *SanXon*, que genera un

gráfico de similitudes que nos ayuda a dicha interpretación (Figura 4.3) (ver detalles en la Tesis Doctoral de Marco Trevisan-Herraz y Material Suplementario del artículo [194]). Este gráfico refleja las relaciones entre un grupo de categorías teniendo en cuenta la cantidad de proteínas que estas comparten. De esta forma en la Figura 4.3 se observa que la información funcional mínima que explica el efecto del estímulo sobre el sistema biológico es una disminución de la categoría "Fibrillar collagen C-terminal".

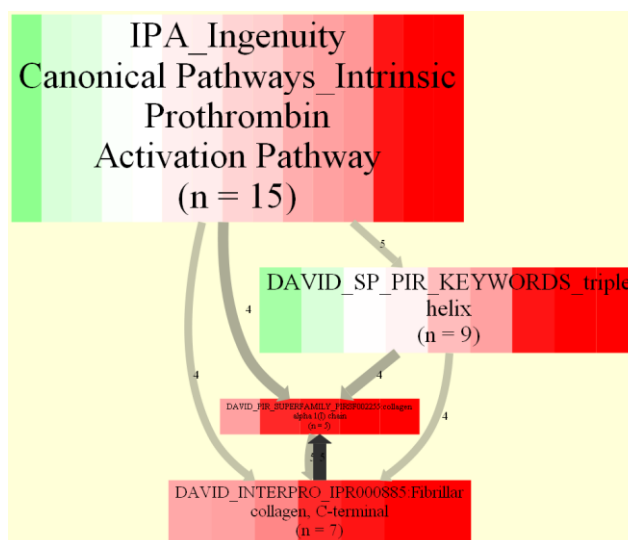


Figura 4.3. Ejemplo de gráfico de similitud generado por Sanson. Cada una de las franjas verticales de cada recuadro (categoría) representa una proteína cuyo color viene definido por su valor Z_{qa} entre -3 y 3. Entre paréntesis viene dado el número (n) de proteínas que componen la categoría. Las relaciones entre las categorías están definidas de tal modo que, el número de proteínas que comparten dos categorías se indique con una fleja gris y si esas proteínas que comparten conforman toda la categoría se muestre una flecha negra.

5. Cuantificación peptídica *label-free* y aplicación del modelo estadístico WSPP a datos provenientes de DIA

La cuantificación de los datos de espectrometría de masas provenientes de DIA se realizó de manera dirigida a partir de la lista de péptidos identificados y validados según los criterios oportunos de FDR como ya se comentó en el apartado 2.3 en las muestras a comparar. Además, como criterio adicional de confianza utilizamos para la cuantificación solamente péptidos proteotípicos, los cuales indican la presencia de una proteína en particular de forma unívoca. Para realizar la cuantificación aplicamos un parámetro nuevo análogo al aplicado en el artículo de *Nature* [198] publicado por el laboratorio. El parámetro cuantitativo al que denominamos *Q-Score*, consiste en sumar cada una de las intensidades de todos los fragmentos que coincidan con la fragmentación teórica de un péptido candidato para un espectro con una tolerancia de 0,001 Da. Los valores de *Q-Score* para cada péptido se calcularon utilizando una versión modificada en nuestro laboratorio del motor de búsqueda libre Comet [199], al que llamamos Comet-Q, por ser cuantitativo. Realizando una búsqueda con aquellos péptidos que habíamos validado

anteriormente, se exportaron a Excel y se calculó el máximo de todas las cuantificaciones de *Q-Score* de los escanes de péptidos con secuencia y carga iguales.

La cuantificación relativa de las muestras a comparar la realizamos aplicando los principios básicos de la proteómica cuantitativa pareada, es decir, calculamos como el \log_2 ratio de las dos muestras que están siendo comparadas, A y B. En este caso de la señal *Q-Score* de un péptido (masa-carga) en su punto máximo de la carrera cromatográfica. Tal y como se indica en la Ecuación 4.

$$X_{eqps} = \log_2 \frac{MAX(Q-Score^A)}{MAX(Q-Score^B)} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Los espectros *s* provenientes del péptido *p*, de la proteína *q* en el experimento *e* y *Q-Score* como medida de la intensidad de cada espectro.

De acuerdo al modelo estadístico WSPP [63, 193], tomamos como peso estadístico el valor máximo *Q-Score* de los espectros de la pareja de péptidos que se están comparando. El resto del procesamiento de datos y análisis estadístico se realizó de forma automática utilizando un flujo de datos en CMD batch ver Anexos (Material Suplementario 1). Así mediante *Klibrate* se calibró de acuerdo a la desviación cuadrática media entre la curva teórica que se ajusta a una función hiperbólica y los datos experimentales, calculado los parámetros k_e y σ^2_p . Una vez calibrados los datos pasamos el GIA implementado en *SanXot*, para integrar la información cuantitativa de péptido a proteína y posteriormente de proteína a media global. Calculando en las integraciones las distintas fuentes de error y eliminando los correspondientes *outliers*, con *SanXot* y *SanXotSieve*, respectivamente, salvo en la última integración en la que se fijó a 0 la varianza a nivel de proteína, para determinar las proteínas que cambian de abundancia en una muestra con respecto de la otra a un corte de FDR del 5%.

5.1. DETERMINACIÓN DE LAS CAPACIDADES CUANTITATIVAS DEL Q-SCORE Y DETERMINACIÓN DEL RANGO LINEAL

Se preparó un lisado de Hela siguiendo los mismos procedimientos que los descritos en el apartado 1.4 de Materiales y Métodos, en cuanto a lisis de las células y digestión del proteoma con tripsina, excepto que en este caso no se realizó ningún tipo de fraccionamiento de los péptidos post-digestión. A 5 μ g del lisado de Hela se añadieron cantidades conocidas y crecientes (5, 25, 100, 500, 2000 y 4000 pg) de 6 péptidos AQUA marcados en lisina y arginina (R (6 ^{13}C y 4 ^{14}N) y K (6 ^{13}C y 2 ^{14}N)) en 0,1% FA y se analizaron en Q-Exactive aplicando el método DiS, tal y como se indica en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos y se cuantificó aplicando el *Q-Score* como se detalla en el apartado anterior.

6. Inmunoblots e inmunofluorescencia

Los inmunoblots se realizaron en el Laboratorio del Dr. Juan Miguel Redondo. Brevemente, a 30 μ g de proteína extraída se les añadió tampón Laemmli (60 mM de Tris-HCl pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 5% de β -mercaptoetanol y 0,01% de azul de bromofenol) y se incubaron durante 10 min a 100°C. Los extractos obtenidos se aplicaron en un SDS-PAGE y se sometieron a electroforesis. Las proteínas presentes en estos geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de una corriente eléctrica continua en presencia del tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 10%). Las membranas se lavaron con tampón Tris-HCl pH 7,5 con detergente 0,05% Tween-20 (TBS-T) y se incubaron durante 30 min con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T. Tras 3 lavados con TBS-T, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios preparados en TBS-T suplementado con BSA al 1% y 0,1% de azida sódica. Tras la incubación con los anticuerpos primarios contra tenascina (TNC) (Millipore, Billerica; MA, USA), trombospondina-1 (THBS1) (Thermo Scientific, Waltham; MA, USA), prostaglandina G/H sintasa 2 (PTGS2 o COX2) (Cayman, Ann Arbor; MI, USA), calcipresina-1 (RCAN1) (Sigma-Aldrich), metionine adenosiltransferasa II β (MAT2 β) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas; TX, USA) y tubulina- α (TUBA1A) (Sigma-Aldrich), las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-ratón o anti-conejo, Pierce, Rockford; IL, USA) durante 1h. Por último, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron con el reactivo ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, Amersham Biosciences, UK) para detectar las proteínas reconocidas por los anticuerpos.

En cuanto a la inmunofluorescencia de VSMC, las células fueron sembradas en cubreobjetos dónde se trataron con 10^{-6} M de AngII durante diferentes tiempos, fueron fijadas con 3% de formaldehído, permeabilizadas con 0,1% de Triton-X-100 y posteriormente teñidas con anti-calponina (CNN) (1/100; Abcam, Cambridge, UK), o con anti-colageno III alfa (COL3A) (1/100; Abnova, Taipei, RC), seguido de la incubación con el anticuerpo secundario marcado Alexa Fluor-488. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Finalmente, los cubreobjetos se montaron y visualizaron usando un microscopio confocal invertido (LSM700, Carl Zeiss, Oberkochen, DE) con un objetivo 25x de aceite. Las imágenes fueron procesadas para presentación con el software Zen 2012 (Carl Zeiss, Oberkochen, DE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio del comportamiento del proteoma de VSMC estimuladas con AngII mediante nuevas aproximaciones de análisis de biología de sistemas

Con el doble objetivo de por un lado (1) comprobar que el algoritmo SBT es capaz de capturar la coordinación del proteoma en experimentos de proteómica cuantitativa en experimentos de alto rendimiento cercanos al proteoma completo y que es un fenómeno reproducible. Y (2) estudiar los mecanismos moleculares por los cuales AngII induce remodelado vascular. Determinamos los cambios relativos en el proteoma de cultivos primarios de células VSMC que se producen mediante la activación con AngII durante diferentes tiempos de inducción. Para ello, comparamos la abundancia relativa de las proteínas identificadas de los extractos de proteínas aislados de células activadas durante 2, 4, 6, 8 y 10h contra células control que no han recibido tratamiento. Los extractos de proteínas fueron digeridos en gel concentrante con tripsina y los péptidos resultantes fueron marcados diferencialmente con iTRAQ 8plex. Una vez marcados, se mezclaron los péptidos provenientes de cada condición, se fraccionaron mediante intercambio catiónico y se analizaron por LC-MS/MS. Comparando las intensidades de los iones reporteros correspondientes e integrando la información cuantitativa desde el nivel de scan hasta proteína, aplicando el modelo WSPP, pudimos determinar cómo varía la abundancia de una determinada proteína con el tiempo. Finalmente aplicamos el SBT, para medir el grado de coordinación adquirido por las proteínas y su reproducibilidad con el tiempo.

1.1. CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA PROFUNDO DE VSMC

A partir de un número total de 2.349.053 espectros de fragmentación obtenidos a partir de 10 carreras LC-MS/MS, se identificaron 43.318 péptidos únicos pertenecientes a 10.593 proteínas únicas con una tasa de error del 5% (5.633 al 1% FDR). La abundancia aproximada de proteínas incluye cerca de 6 órdenes de magnitud (Figura 1, A), pudiendo afirmar que se detectaron proteínas con tan solo 55 copias por célula. Cabe destacar, que los datos incluyen un gran número de proteínas reguladoras, como 438 factores de transcripción, 254 quinasas, 137 fosfatasa y 389 proteínas implicadas en el ciclo celular.

En el artículo de referencia en cuanto a profundidad de un análisis proteómico [200] Picotti y colaboradores establecen una serie de hitos acerca de la detectabilidad de una proteína en un proteoma complejo. Utilizando la metodología proteómica más sensible, SRM en un equipo 4000QTrap, son capaces de detectar proteínas incluidas en 6 órdenes de magnitud, algunas de las cuales con menos de 40 copias por célula. Aunque no se trata del último equipamiento disponible en el mercado a día de hoy, el SRM teóricamente es mucho más sensible que la metodología *shotgun* empleada en nuestro trabajo, aunque

tiene otras limitaciones, ya comentadas en la introducción; ambos trabajos son comparables en cuanto a rango dinámico y sensibilidad.

La señal bruta de intensidad MS de los péptidos identificados de cada proteína se puede utilizar para estimar la cantidad absoluta de las mismas [81, 201, 202]. Para calcular la abundancia aproximada de cada proteína usamos el algoritmo iBAQ [82] en el cual se normaliza el sumatorio de las intensidades por el número de péptidos teóricamente observables de cada proteína. Las 24 proteínas más abundantes suponen el 25% del proteoma o primer cuartil (Figura 1, B), las cuales son mayoritariamente glucolíticas y citoesqueléticas como vimentina, alfa actina 2, actina específica de músculo liso [203]; piruvato quinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, enolasa 1, alfa tubulina-1A, profilina 1 y anexina 2 contribuyendo cada una a más del 1% del total del proteoma, junto con múltiples troponinas y tropomiosinas, lo cual es reflejo de la especialización biológica de estas células. Un conjunto adicional de 96 proteínas, que representa el segundo cuartil (Figura 1, B), contiene mayoritariamente proteínas implicadas en funciones de la maquinaria celular básica incluyendo histonas, proteínas de plegamiento, proteínas de unión a calcio y ribosomas (Figura 2), cuya mayor abundancia está de acuerdo con lo obtenido en otros proteomas humanos y murinos, donde el 70% de la masa proteica total está compuesta por proteínas *housekeeping* [204-206]; mientras que las proteínas reguladoras son mucho menos abundantes.

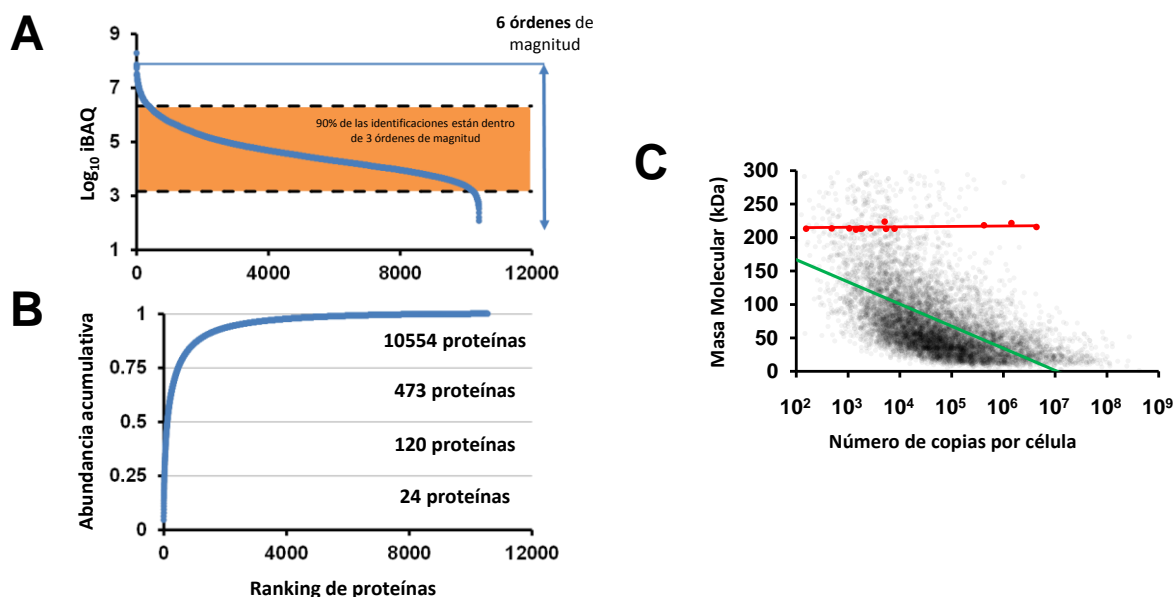
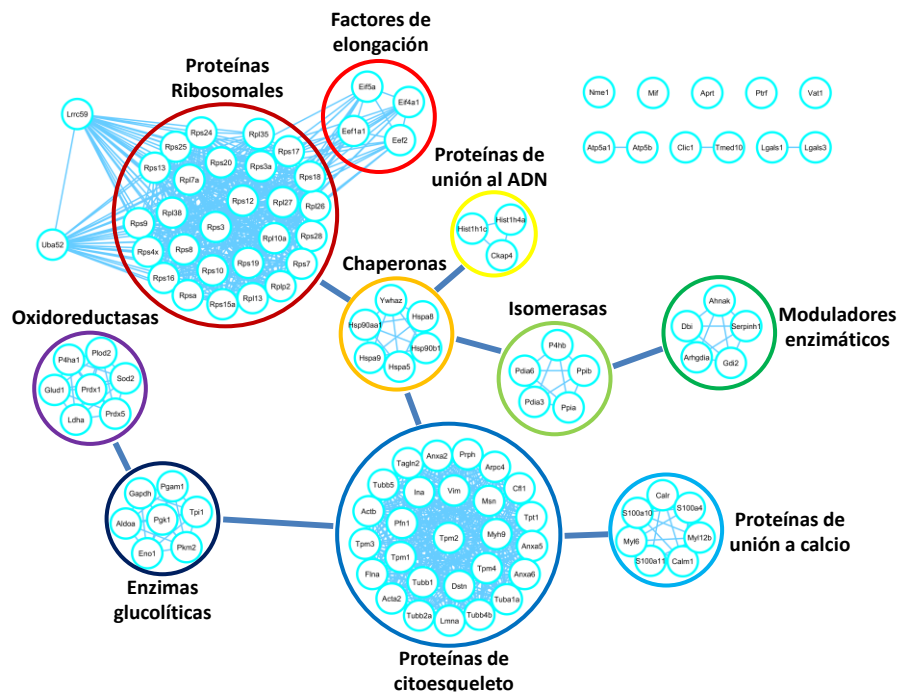


Figura 1. La profundidad del análisis proteómico permitió cubrir 6 órdenes de magnitud de abundancia de proteínas expresadas por VSMC. (A) Masa proteica acumulativa de más a menos abundante expresadas en unidades log₁₀ de iBAQ. **(B)** Ranking de abundancia de proteínas de mayor a menor. **(C)** Masa molecular de las proteínas frente al número de copias de la misma en una única célula. En rojo se muestra la tendencia de las proteínas motoras (MYH) y en verde la tendencia general de todas las proteínas.

La contribución general de cada proteína a la masa total junto con el conocimiento de la masa proteica de una única célula muscular, publicada y tabulada por Wisniewski y colaboradores en 2014 [207], la cual ronda los 450 pg por célula muscular. Nos sirve para calcular el número absoluto de copias de una proteína en una única célula de músculo liso vascular aplicando la ecuación 3 (ver Materiales y Métodos apartado 3.1.1). En la Figura 1, C; observamos que la masa molecular promedio de las proteínas de músculo liso vascular es similar a la de otros tejidos entre 40 y 50 kDa [207]. Siguiendo una tendencia general, que es independiente de tejido [207], a medida que se aumenta la masa molecular de las proteínas, el número de copias expresadas por la célula disminuye (Figura 1, C, línea verde), lo cual no hace otra cosa que reflejar una ventaja evolutiva que supone evitar el mayor coste biosintético [208] que significa sintetizar una proteína de alto peso molecular. Sin embargo, cabe destacar que en nuestro modelo dada su alta especialización, algunas proteínas como las proteínas motoras suponen una notable excepción a esta tendencia, puesto que proteínas de un alto peso molecular (>200 kDa) son muy abundantes encontrándose con más de 1 millón de copias por célula (Figura 1, C, línea roja). Este resultado, pone de manifiesto que debido a la gran especialización de las células diferenciadas son capaces de ir en contra de la tendencia evolutiva lógica invirtiendo mayor energía para producir aquellas estructuras que les son útiles para llevar a cabo su función específica, en este caso, regular el tono vascular gracias a la capacidad contráctil de las mismas.



1.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO EN PROFUNDIDAD DE LOS CAMBIOS DINÁMICOS PRODUCIDOS EN EL PROTEOMA DE VSMC SUJETOS A TRATAMIENTO CON ANGII

Desde el punto de vista de la cuantificación diferencial y el análisis estadístico de los datos cuantitativos, cabe destacar que tanto la variabilidad a nivel de espectro, péptido o proteína así como el número de valores atípicos (*outliers*) detectados en sendos niveles se mantuvieron dentro de unos rangos esperados (Tabla 1) con respecto a otros proteomas analizados anteriormente [63, 193]. Los valores de constante de calibración, propios y únicos para cada tipo de marcaje y sistema de análisis (HPLC, espectrómetro de masas y modo de adquisición) se mantuvieron en el orden de miles de unidades; mientras que las varianzas a nivel de espectro y péptido se mantuvieron en órdenes de unas pocas décimas. El porcentaje de valores atípicos determinados al 5% de FDR en las diferentes comparativas y en ambos niveles, valores que se salen de la distribución $N(0, 1)$ debidos bien a malas identificaciones, digestiones parciales, presencia de modificaciones o bien debido a la presencia de péptidos redundantes; permaneció siempre muy próximo al 3%. Sugiriendo que el análisis MS, la digestión de las proteínas, el marcaje de los péptidos y la identificación de los mismos se llevó a cabo dentro de los estándares esperados. Mención aparte merecen las desviaciones de los valores de las cuantificaciones a nivel de proteína con respecto de la media global ($FDR_{qa} < 1\%$) los cuales representan cambios reales de abundancia de proteínas.

Tabla 1. Resumen estadístico de identificación y cuantificación de VSMC tratadas con AngII a diferentes tiempos sujetas a marcaje iTRAQ:

Técnica de marcaje	NS ¹	NP ²	NQ ³	k_e	Varianza de espectro (σ^2_s)	Varianza de péptido (σ^2_p)	Varianza de proteína (σ^2_q)	Espectros <i>Outliers</i> (%)	Péptidos <i>Outliers</i> (%)	Cambio de abundancia de proteínas ⁴
iTraq 8plex VSMC AngII 2h	215806	43318	10530	1372,32	0,0390	0,0472	0,0008	2,93	3,01	16
iTraq 8plex VSMC AngII 4h				1035,99	0,0429	0,0352	0,0024	2,66	3,03	44
iTraq 8plex VSMC AngII 6h				1040,51	0,0331	0,0278	0,0020	2,56	3,08	65
iTraq 8plex VSMC AngII 8h				1581,01	0,0358	0,0401	0,0025	2,69	3,16	36
iTraq 8plex VSMC AngII 10h				1179,71	0,0378	0,0393	0,0012	2,60	3,29	52

¹Número de espectros únicos identificados y cuantificados; ²Número de péptidos únicos identificados y cuantificados; ³Número de proteínas únicas identificadas y cuantificadas; ⁴Número de proteínas que cambian de abundancia. Valores atípicos (*outliers*) a nivel de espectro, péptido y proteína en categoría, así como los cambios de abundancia de proteína y de categoría al 5% FDR.

Cabe destacar que la determinación conservativa del valor de la varianza a nivel de proteína, es decir, la variabilidad de la abundancia relativa de las proteínas entre sí, se realizó teniendo en cuenta una mejora del modelo estadístico introducido (ver Materiales

y Métodos: Análisis mediante biología de sistemas, el Triángulo de Biología de Sistemas (SBT)). En él, se asume que la varianza tiene dos componentes: una variabilidad de base debida al proteoma o técnica, y otra debida al estímulo biológico producido. Para separar ambos componentes, primero calculamos la variabilidad de las abundancias relativas de las proteínas dentro de las categorías funcionales en las que están clasificadas, lo cual no debería depender del estímulo, y a continuación calculamos la variabilidad de las categorías entre sí, que sí dependerá de la reacción a dicho estímulo.

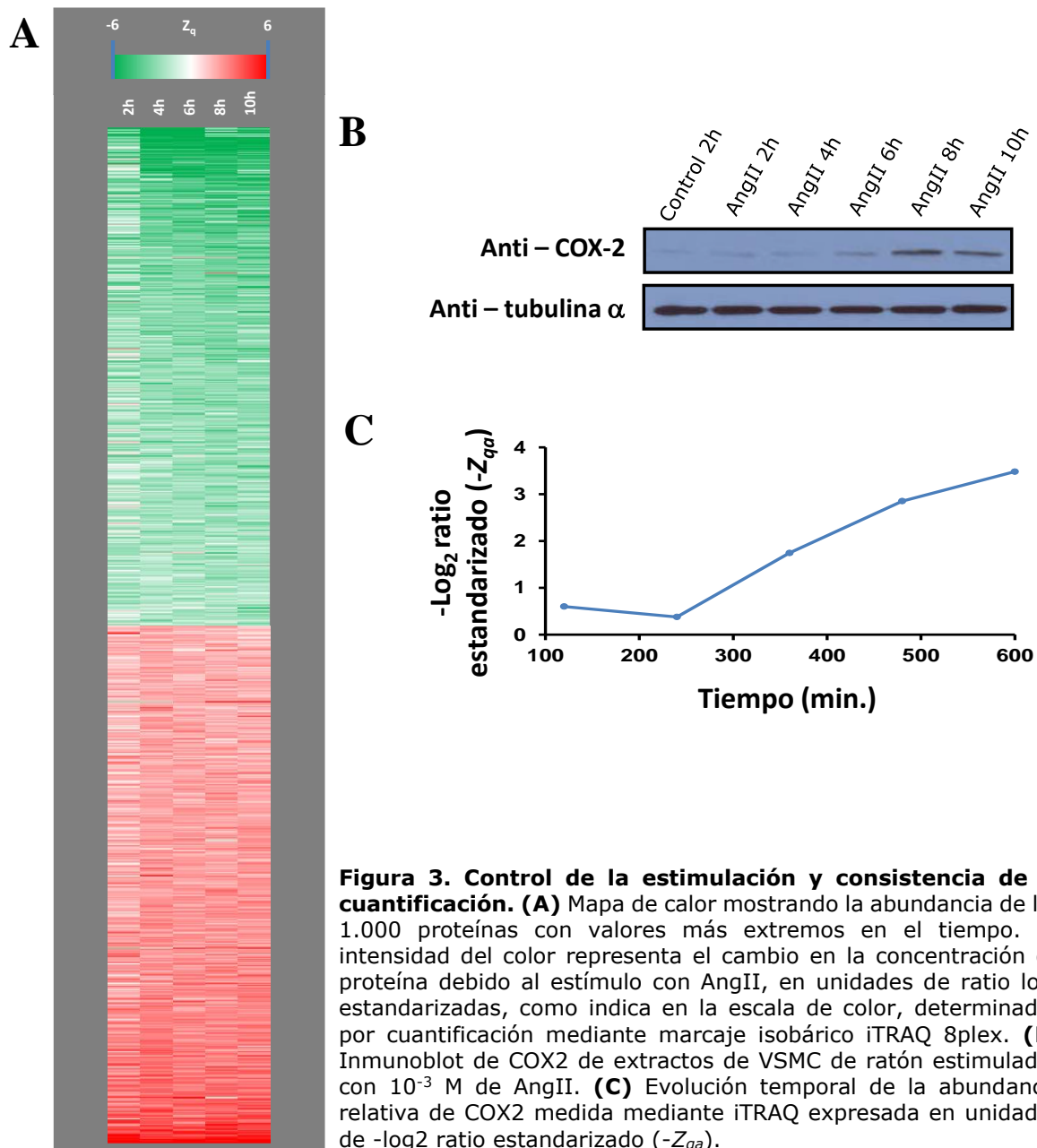


Figura 3. Control de la estimulación y consistencia de la cuantificación. (A) Mapa de calor mostrando la abundancia de las 1.000 proteínas con valores más extremos en el tiempo. La intensidad del color representa el cambio en la concentración de proteína debido al estímulo con AngII, en unidades de ratio \log_2 estandarizadas, como indica en la escala de color, determinadas por cuantificación mediante marcaje isobárico iTRAQ 8plex. **(B)** Inmunoblot de COX2 de extractos de VSMC de ratón estimuladas con 10^{-3} M de AngII. **(C)** Evolución temporal de la abundancia relativa de COX2 medida mediante iTRAQ expresada en unidades de $-\log_2$ ratio estandarizado ($-Z_{qa}$).

La estimulación por AngII fue controlada mediante inmunoblot previo al análisis proteómico midiendo la abundancia de COX2 (PTGS2) (Figura 3, B) observando una clara inducción de la misma a partir de las 4h de estimulación, tal y como esperábamos [210]. Una vez hecha la cuantificación y el análisis estadístico observamos unos

resultados similares al cuantificar la proteína COX2 mediante iTRAQ (Figura 3, C) en términos de $-\log_2$ ratio estandarizado ($-Z_{qa}$) de las muestras estimuladas a diferentes tiempos contra el control. Además, controlamos la consistencia con el tiempo de los datos cuantitativos (Figura 3, A), representando el mapa de calor de la variable estandarizada de las mil proteínas con valores más extremos, en el que observamos que una vez iniciada la inducción a partir de 4h el signo y la intensidad del cambio permanecían constantes en prácticamente todas las proteínas. Por tanto, podemos considerar que los cambios de abundancia estaban siendo detectados de manera fiable. En total, detectamos más de 150 proteínas que cambian significativamente su abundancia en al menos un tiempo de estimulación, alcanzando un máximo a las 6h de tratamiento (Figura 4, A).

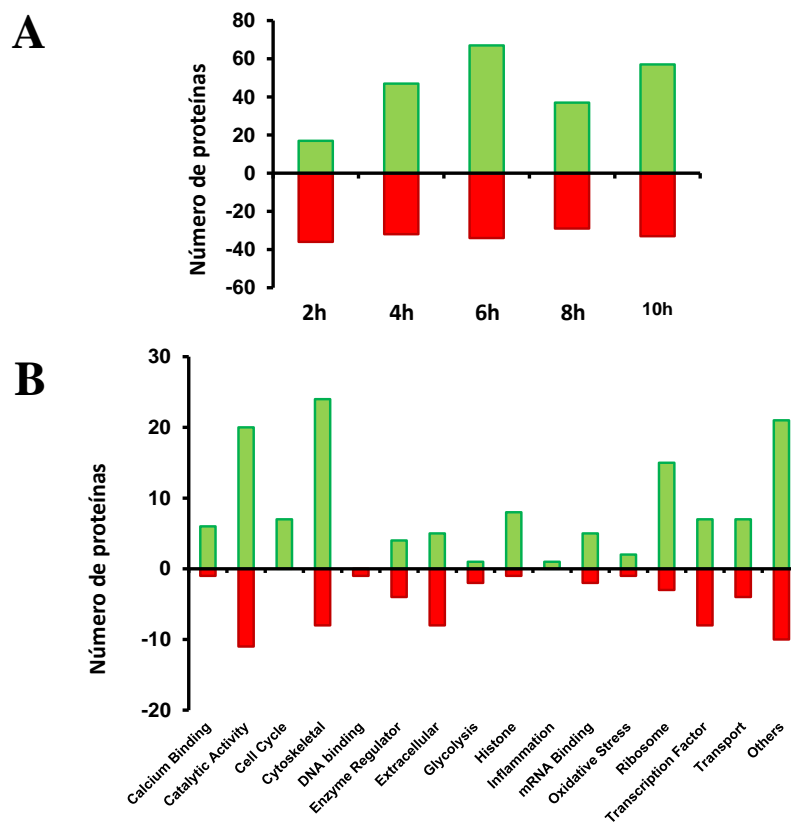


Figura 4. Cambios de proteínas ($FDR_{qa} < 1\%$) producidos por la estimulación con AngII. (A) Número de cambios producidos en cada uno de los tiempos de estimulación ($FDR_{qa} < 1\%$), en verde se muestran los aumentos y en rojo las disminuciones de abundancia relativa. **(B)** Clasificación funcional de las proteínas que cambian en al menos un tiempo ($FDR_{qa} < 1\%$) debido al estímulo. En verde se muestran los aumentos y en rojo las disminuciones.

La clasificación funcional básica (Figura 4, B) de la lista de proteínas que pasan el umbral de corte estadístico ($FDR_{qa} < 1\%$) en al menos uno de los tiempos de análisis muestra que la mayoría son proteínas de unión a calcio, proteínas contráctiles, proteínas extracelulares y ribosomales, entre otras. Este análisis clásico a nivel de proteína individual, aunque simplifica muchísimo la cantidad de datos a ser analizados, ignora la gran mayoría de la información cuantitativa adquirida.

Una vez alcanzado el nivel de profundidad de análisis adecuado, el verdadero desafío de este tipo de experimentos es extraer un significado biológico, a partir de pistas biológicas que serían cada una de las entidades de dichas listas, es decir, las proteínas identificadas en cada experimento [142]. Este tipo de aproximaciones tiene algunas limitaciones: (1) en ocasiones después de las correcciones oportunas no hay proteínas que a título individual pasen el corte de significatividad estadística, porque las diferencias biológicamente relevantes son muy sutiles y generalmente despreciables frente al ruido inherente a la propia técnica de detección como es la espectrometría de masas. (2) Por otra parte, aunque puede ser complementario al caso anterior, [211] es muy difícil interpretar una lista enorme de proteínas en las que no hay en principio, ningún criterio que unifique a los miembros de la propia lista de manera inmediata. Además, (3) se pueden perder importantes efectos que tienen lugar sobre rutas o procesos celulares en las que grupos de proteínas se mueven actuando en concierto. Por ejemplo, puede que un incremento de un 20% en todas las proteínas de una ruta metabólica podría hacer que se alterara de manera más drástica el flujo metabólico a través de una ruta que un aumento de 10 veces el ratio de cambio en una única proteína. Y finalmente, (4) debido a la aleatoriedad de los métodos de adquisición dependiente de datos, dos experimentos independientes del mismo modelo biológico en ocasiones muestran un pobre solapamiento, por lo que comparar resultados es muy difícil. Para ayudar a resolver este tipo de cuestiones y otras relativas al modo en que las proteínas responden a un determinado estímulo biológico, desarrollamos y aplicamos el modelo estadístico de biología de sistemas publicado en [165] y en la Tesis Doctoral de Marco Trevisan-Herraz, como se detalla a continuación.

1.3. EVIDENCIA DE QUE EL COMPORTAMIENTO COORDINADO DE LAS PROTEÍNAS SE VA ADQUIRIENDO CON EL TIEMPO

Ninguno de los modelos de análisis funcional existentes permite la detección sistemática y la caracterización del comportamiento coordinado de las proteínas, lo cual es crucial para entender cómo funciona una célula. Aplicando secuencialmente el GIA, desarrollamos unos flujos de trabajo automáticos para el análisis convencional de experimentos pareados de proteómica cuantitativa, en el cual los cambios de abundancia de proteínas significativos son detectados como *outliers* en el paso de integración de proteína a media global, es decir, midiendo como varían las proteínas entre sí. Posteriormente, aplicamos el GIA para construir el Triángulo de Biología de Sistemas, un flujo de trabajo que lleva a cabo una integración de proteína a categoría, elimina los *outliers* dentro de cada categoría y detecta los cambios de abundancia significativos producidos por el comportamiento coordinado de sus proteínas (Figura 4.1 de Materiales y Métodos). En paralelo el SBT detecta cambios de abundancia en proteínas. Finalmente,

definimos el grado de coordinación de la respuesta biológica como la medida de la fracción de proteínas que se mueven de manera coordinada (Figura 4.2 de Materiales y Métodos).

Para determinar si el modelo es capaz de detectar coordinación de los cambios de abundancia de proteínas durante el tiempo, analizamos los ya comentados, cultivos primarios de VSMC estimulados con AngII. Este experimento, además sirve para probar si la coordinación de una misma proteína podría ser reproduciblemente observada en preparaciones biológicas diferentes del mismo tipo celular, ya que en ese sentido estaríamos analizando réplicas biológicas aunque con ligeras diferencias en los tiempos de incubación, encontrar consistencias en los cambios de proteínas, nos refuerza los resultados.

Para estudiar dicho comportamiento del proteoma de VSMC en su conjunto fuimos unos pasos más allá en la aplicación del modelo estadístico WSPP desarrollado en nuestro laboratorio [63, 193] generando el denominado Triángulo de Biología de Sistemas. En dicho triángulo asumimos la distribución normal $N(0, 1)$ de las proteínas dentro de las categorías y detectamos como proteínas *outliers* aquellas que se desvían más de lo permitido de la media de categoría. La información cuantitativa de proteínas la integramos en categorías funcionales, utilizando la información de anotación de genes y/o proteínas a partir de Ingenuity [195, 196], la base de datos DAVID [84] y la base de datos de complejos proteicos curados CORUM [197] para crear una base de datos de más de 4.500 categorías. Los mencionados *outliers* de categoría suponen una proporción muy pequeña de las proteínas, por debajo del 3% en todos los casos (Tabla 2) y no se detectaron cambios de categoría usando categorías aleatorias (Figura 5, A).

Tabla 2. Resumen estadístico de biología de sistemas de VSMC tratadas con AngII a diferentes tiempos sujetas a marcaje iTRAQ:

Técnica de marcaje	NQC ¹	NC ²	Varianza de proteína-categoría (σ^2_{QC})	Proteínas outlier de categoría (%)	Varianza de categoría (σ^2_{QC})	Cambios de categoría ³
iTraQ 8plex VSMC Ang II 2h	227346	4579	0,0008	2722 (1,19%)	0,00014	7
iTraQ 8plex VSMC Ang II 4h			0,0024	5028 (2,21%)	0,00022	98
iTraQ 8plex VSMC Ang II 6h			0,0020	5289 (2,32%)	0,00015	126
iTraQ 8plex VSMC Ang II 8h			0,0025	4067 (1,78%)	0,00022	152
iTraQ 8plex VSMC Ang II 10h			0,0012	4724 (2,07%)	0,00027	92

¹Número de relaciones proteína > categoría; ²Número de categorías analizadas; ³Número de categorías que cambian de abundancia detectadas al 5% FDR_{ca}.

Cuando el ratio cuantitativo de las proteínas *outlier* no se tiene en cuenta para el cálculo de la media de las categorías, terminamos con categorías que tan solo contienen proteínas que se mueven al unísono u homogéneas. Con las medias de los ratios cuantitativos de estas categorías volvimos a hacer la media ponderada, lo que nos permitió detectar las categorías homogéneas que cambian debido al estímulo. Por tanto, nuestro modelo es capaz de capturar la coordinación del proteoma. En este sentido, definimos el

grado de coordinación como la proporción de proteínas que cambian en concierto en el total de cambios de proteínas que cambian de abundancia por sí mismas o como parte de alguna categoría que cambie de abundancia (ver Materiales y Métodos: Análisis mediante biología de sistemas, el Triángulo de Biología de Sistemas (SBT) párrafo dedicado a la definición del grado de coordinación). Además, es importante tener en cuenta que podemos rastrear las proteínas con valores atípicos con respecto de la categoría puesto que estas pueden ser importantes puntos de control en rutas de señalización, jugar diferentes papeles en complejos proteicos o tener una regulación diferencial en comparación con el resto de las proteínas de su categoría. Este punto se discute más adelante.

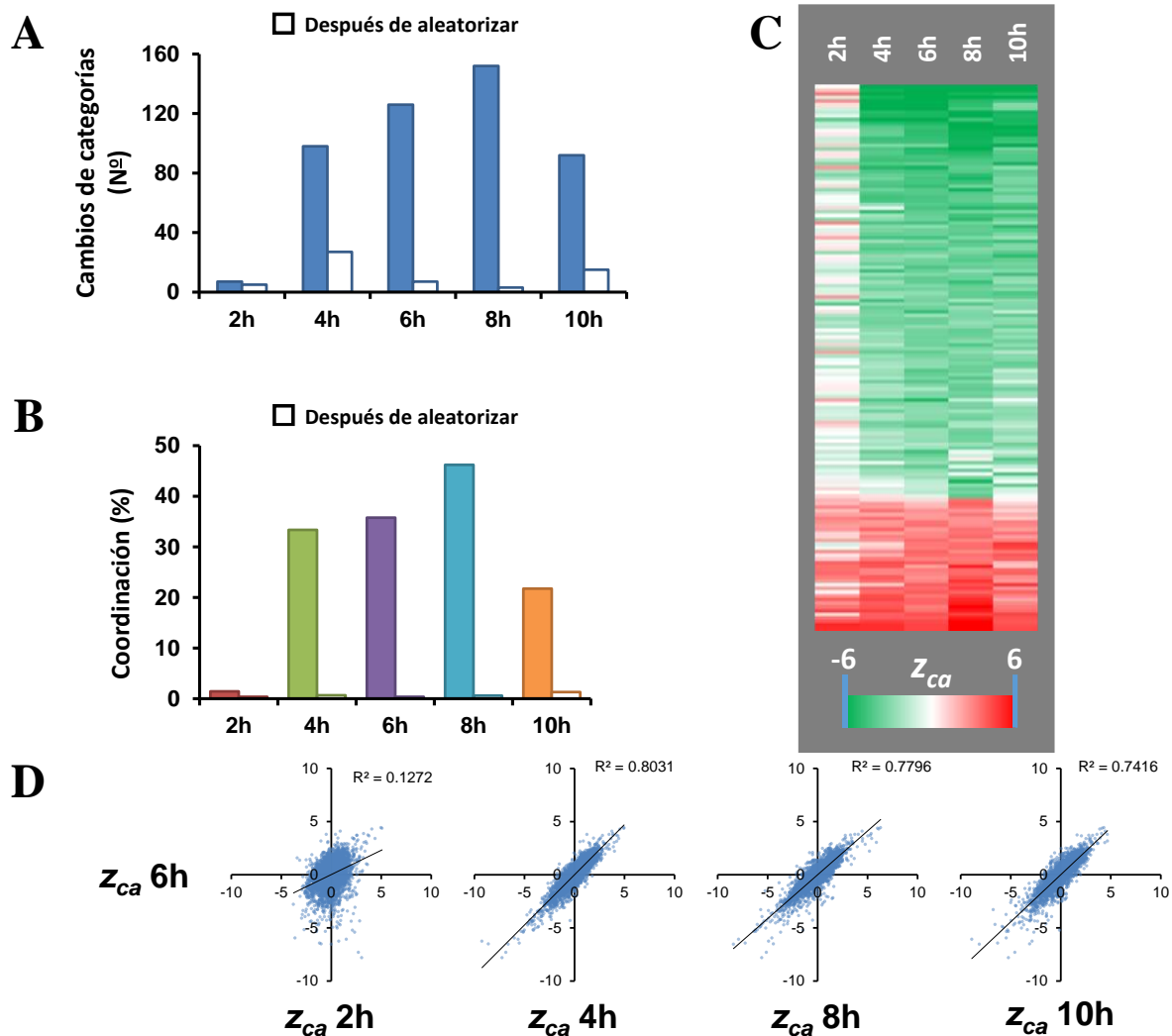


Figura 5. Medición de la coordinación en VSMC estimuladas con AngII. (A) Número de categorías que cambian en cada tiempo de estimulación usando la base de datos IPA + DAVID de categorías funcionales con sentido biológico (barras rellenas) y utilizando una base de datos de categorías aleatorias (barras blancas). (B) Porcentaje de coordinación medido en cada uno de los tiempos de estimulación usando la base de datos biológica (barras rellenas) y después de aleatorizar (barras blancas). (C) Mapa de calor de cada una de las categorías que cambian de manera significativa ($FDR_{ca} < 5\%$) bajo el estímulo de AngII. La intensidad del color representa el cambio de las categorías en unidades de ratio \log_2 estandarizadas, como indica la escala de color, determinadas por cuantificación mediante marcaje isobárico iTRAQ 8plex. (D) Correlación entre todas las categorías cuantificadas en cada uno de los tiempos contra 6h.

Después de eliminar proteínas *outlier* de categoría, se puede observar un claro patrón de coordinación en cambios de categoría, pero solamente después de 4h de tratamiento con AngII (Figura 5, B-D), como control negativo, usamos una red de relaciones *proteína* > *categoría* generada de manera aleatoria, las cuales resultaron completamente no coordinadas (Figura 5, B, barras vacías). El análisis de correlación revela que las categorías alteradas a 4, 8 y 10h, pero no a las 2h, además esencialmente, eran las mismas que se alteraban a las 6h (Figura 5, D). Consistentemente, a 2h prácticamente todas las proteínas cambian de manera no-coordinada y por tanto fueron detectados como *outliers* de categoría (Figura 12, A). Este resultado indica que las proteínas comienzan a cambiar a tiempos muy cortos, pero este cambio tiene lugar de una manera predominantemente no-coordinada y el comportamiento coordinado es adquirido de forma gradual a tiempos posteriores (Figura 5, B).

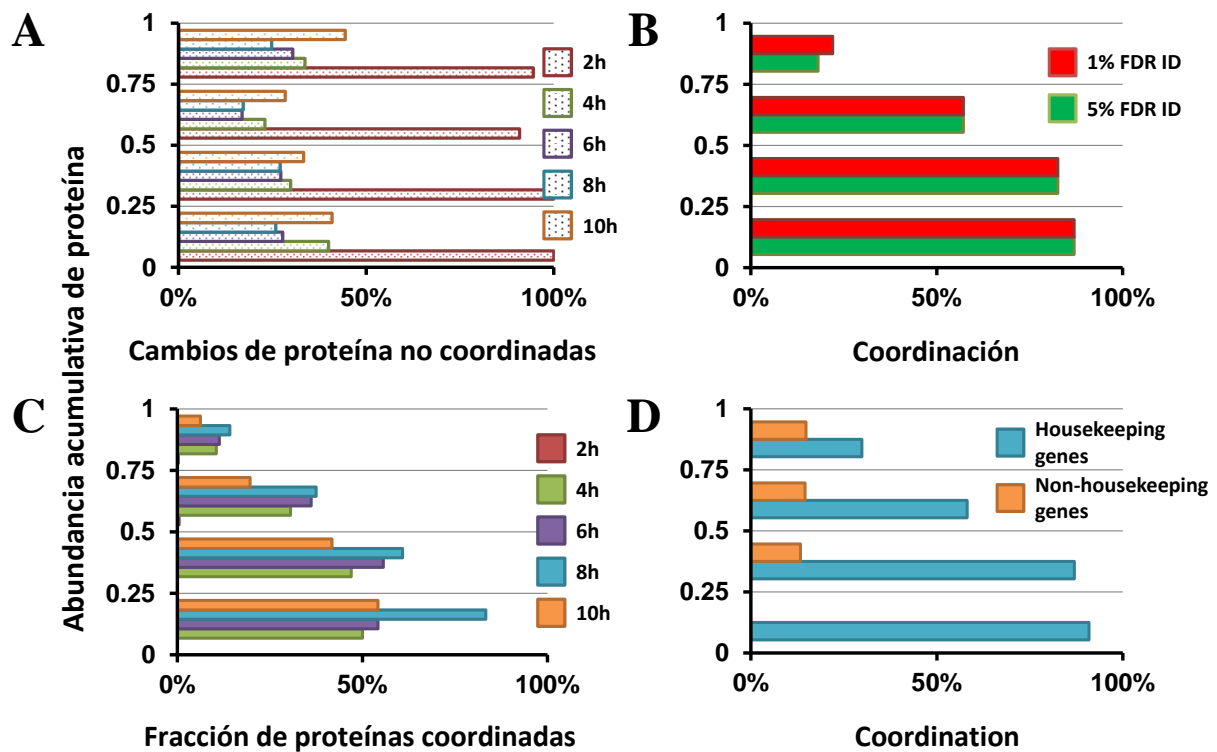


Figura 6. Estudio de la distribución de la coordinación en los cuartiles de abundancia absoluta. (A) Distribución de los cambios de proteína no coordinadas en los cuatro cuartiles de abundancia absoluta según iBAQ a los diferentes tiempos de análisis. (B) Distribución de la coordinación de proteínas dentro de los cuatro cuartiles iBAQ a 1% (barras rojas) y 5% (barras verdes) FDR de identificación. La coordinación fue calculada considerando todas las proteínas en los cinco tiempos. (C) Distribución de las proteínas coordinadas en los cuatro cuartiles de abundancia iBAQ a los diferentes tiempos de tratamiento, en relación al número total de proteínas en cada cuartil. (D) Distribución de la coordinación de proteínas dentro de los cuatro cuartiles iBAQ para las proteínas *Housekeeping* (barras azules) y las proteínas no *housekeeping* (barras naranjas).

Observamos que mientras los *outliers* de categoría tienden a distribuirse homogéneamente en los cuatro cuartiles de abundancia, lo que sugeriría que su detección no está sesgada por su abundancia (Figura 6, A), la proporción de proteínas que cambian

de manera coordinada tienden a aumentar con su abundancia (Figura 6, C). Es interesante remarcar que la mayoría de las proteínas de los cuartiles de mayor abundancia fueron coordinadas (Figura 6, B, barras rojas); además, relajando la umbral de corte de FDR de identificación no mejora la detección de proteínas coordinadas en esos cuartiles (Figura 6, B, barras verdes). Consistentemente, aunque se detectó coordinación para múltiples proteínas no *housekeeping* de cuartiles de baja abundancia (Figura 6, D, barras naranjas), la mayoría de las proteínas *housekeeping* estaban coordinadas (Figura 6, D, barras azules), indicando que para mantener la homeostasis celular se requiere una regulación fina de la abundancia de proteínas inducidas por estimulación con AngII.

1.4. ANGII PROMUEVE CAMBIOS DE PROTEÍNA COORDINADOS CONSISTENTES CON UN FENOTIPO HIPERTRÓFICO Y CONTRÁCTIL DE VSMC

Una vez respondida la cuestión sobre la manera en que ocurren los cambios producidos en las VSMC bajo el tratamiento con AngII, es decir, comprobado el comportamiento coordinado del proteoma inducido de VSMC, el siguiente paso es interpretar dichos cambios de rutas, complejos o procesos biológicos específicos a nivel molecular y que van a reflejar los rasgos del fenotipo de VSMC. Debido al uso de múltiples bases de datos de categorías funcionales y su naturaleza redundante, existe una gran proporción de categorías que cambian en respuesta a AngII, muchas de ellas compuestas por el mismo o similar conjunto de proteínas. Para simplificar la interpretación biológica de los resultados, desarrollamos un algoritmo de agrupamiento (*clustering*) (ver Materiales y Métodos: apartado 4.3.) el cual agrupa categorías que contienen proteínas similares en *clusters* funcionales, por lo que una categoría representativa puede definir cada *cluster* (Figura 4.3. de *Materiales y Métodos*). Este paso redujo a 25 el número total de categorías de proteínas sensibles a AngII que cambian de manera coordinada (Tabla 3). Cabría destacar que más de un tercio de las categorías corresponden a complejos proteicos descritos en CORUM. Estos resultados correlacionan perfectamente con el comportamiento coordinado esperado de las proteínas que forman complejos [153, 160, 214].

Un subconjunto de estos complejos están implicados en el empaquetamiento del DNA y en el *splicing* o procesamiento alternativo del *mRNA*, incluyendo al nucleosoma central, compuesto por histonas que constituyen el andamiaje básico para el empaquetado del DNA [9], y las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares ("*Like-Sm ribonucleoproteins*") que forman parte del espliceosoma (Figura 7). Otros complejos relacionados estaban implicados en la síntesis de proteínas ribosomales, como las subunidades ribosomales 40S y 60S, además de proteínas de plegamiento y degradación, que incluyen el complejo prefoldina, la partícula central del proteasoma 20S y las ciclofilinas que también han sido descritas, como parte del espliceosoma [10]. Todas estas categorías dibujan una clara

fotografía que refleja una activación coordinada de la maquinaria de síntesis, plegamiento y renovación de proteínas (Figura 7).

Tabla 3. Grupos o Clusters de categorías seleccionados:

Categoría Representativa de Cluster Funcional (ID) ¹	2h		4h		6h		8h		10h	
	Z _{ca} ²	FDR _{ca} ³	Z _{ca}	FDR _{ca}	Z _{ca}	FDR _{ca}	Z _{ca}	FDR _{ca}	Z _{ca}	FDR _{ca}
Muscle protein (KW-0514)	-0.01	1.00	-6.40	0.00	-6.13	0.00	-8.41	0.00	-8.35	0.00
Tropomyosin (IPR000533)	1.51	0.91	-5.53	0.00	-5.91	0.00	-7.90	0.00	-9.01	0.00
IPA Upstream Regulator MAP3K1	-1.46	0.93	-3.90	0.01	-4.55	0.00	-6.03	0.00	-6.65	0.00
Nucleosome core	0.75	0.97	-9.16	0.00	-6.13	0.00	-4.90	0.00	-2.89	0.12
B-Ksr1-MEK-MAPK-14-3-3 complex	-0.63	0.98	-4.33	0.00	-5.27	0.00	-6.04	0.00	-5.42	0.00
40S ribosomal subunit, cytoplasmic	1.33	0.95	-5.91	0.00	-6.17	0.00	-5.29	0.00	-5.45	0.00
ARF/SAR superfamily (IPR006689)	-2.73	0.44	-4.05	0.01	-4.96	0.00	-6.01	0.00	-3.40	0.04
SM22/calponin (IPR003096)	0.15	0.99	-3.61	0.02	-4.82	0.00	-5.80	0.00	-5.81	0.00
60S ribosomal subunit, cytoplasmic	3.21	0.24	-6.18	0.00	-6.05	0.00	-4.61	0.00	-4.00	0.01
Arp2/3 protein complex	-1.49	0.92	-3.56	0.03	-3.85	0.01	-4.32	0.00	-4.09	0.00
Like-Sm ribonucleoprotein, eukaryotic and archaea-type, core (IPR006649)	-0.11	1.00	-4.39	0.00	-4.14	0.00	-3.77	0.01	-3.04	0.09
Prefoldin	-0.93	0.97	-3.35	0.04	-3.61	0.02	-3.40	0.03	-3.37	0.04
F1FO-ATP synthase (EC 3.6.3.14), mitochondrial	-2.13	0.71	-3.43	0.04	-2.43	0.29	-3.02	0.08	-2.45	0.25
Cyclophilins, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase domain containing proteins (PTHR11071)	0.41	0.99	-3.65	0.02	-3.34	0.04	-3.75	0.01	-3.00	0.10
Regulation of PGC-1α (Biocarta)	0.69	0.97	-3.94	0.01	-3.87	0.01	-2.83	0.11	-3.01	0.09
20S proteasome	-0.52	1.00	-3.20	0.06	-3.09	0.08	-3.56	0.02	-2.24	0.34
Cytoskeletal regulation by Rho GTPase (P00016)	-1.32	0.96	-2.13	0.45	-2.69	0.19	-3.51	0.02	-2.41	0.27
5HT3 type receptor mediated signaling pathway (P04375)	-1.32	0.95	-2.13	0.45	-1.73	0.61	-2.26	0.28	-3.44	0.03
Antioxidant (KW-0049)	2.39	0.60	-2.22	0.42	-2.98	0.10	-3.69	0.01	-3.83	0.01
Gluconeogenesis (KW-0312)	-0.02	1.00	-1.70	0.66	-2.49	0.27	-3.27	0.04	-2.16	0.37
Glutamine amidotransferase (KW-0315)	1.04	0.95	2.26	0.39	2.77	0.16	3.26	0.04	3.29	0.05
DNA-dependent ATPase MCM (IPR001208)	-0.50	1.00	1.25	0.83	3.74	0.01	4.07	0.00	4.67	0.00
Homocysteine Biosynthesis	3.47	0.13	2.83	0.15	3.03	0.09	2.67	0.15	3.62	0.02
Collagen (KW-0176)	3.73	0.08	4.03	0.01	3.45	0.03	3.31	0.04	1.68	0.59
Complement pathway (KW-0180)	0.90	0.97	3.73	0.02	4.06	0.01	4.46	0.00	4.48	0.00

¹Identificador de la categoría seleccionada, la ausencia del mismo significa que procede de la base de datos de complejos curados CORUM. ²Z_{ca}, log₂ ratio corregido y estandarizado a nivel de categoría. ³FDR_{ca}, tasa de valores que se desvían de la media cuantificación a nivel de categoría.

Además, detectamos un grupo de categorías que muestran un incremento coordinado y que estarían asociadas con el fenotipo contráctil y diferenciado (Figura 8), como las proteínas musculares, tropomiosinas y otros componentes bien conocidos de músculo liso (proteínas relacionadas con SM22 y calponinas) [11]. Por ejemplo, observamos un incremento coordinado en proteínas que componen el complejo B-Ksr1-MEK-MAPK-14-3-3 el cual es un andamio integrador de la acción de diversas proteínas como quinasas, factores de transcripción y moléculas apoptóticas [12]. Este complejo se trasloca a la membrana plasmática en respuesta a diversos factores de crecimiento, regulando la señalización por Ras y finalmente puede producir un abanico de diferentes respuestas en VSMC, desde la contracción a la proliferación [13]. Otras categorías que incrementan coordinadamente incluyen los receptores de tipo 5HT3, los cuales promueven la liberación de calcio de almacenes intracelulares, causando la contracción muscular en músculo liso [14]. También se observa el incremento en la abundancia de proteínas activadas por calcio están implicadas en la regulación de PGC-1α, lo cual está claramente de acuerdo con el aumento de la capacidad contráctil de VSMC, ya que PGC-1α promueve la biogénesis de mitocondrias [15], un importante almacén intracelular de calcio y un mediador clave de la contracción muscular. De acuerdo con lo anterior, también

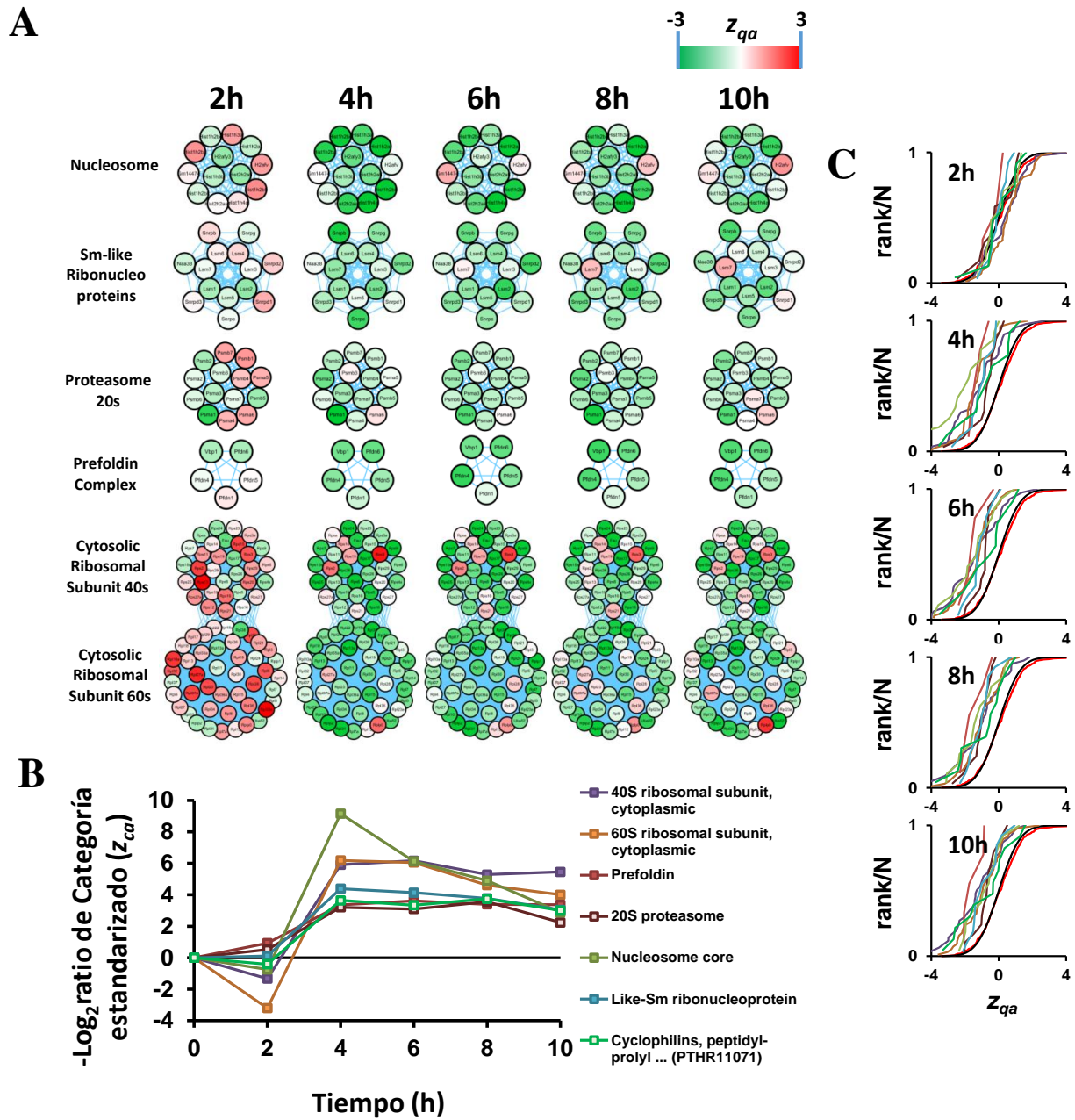


Figura 7. AngII promueve una activación coordinada de la síntesis, plegamiento y renovación de proteínas en VSMC. (A) Evolución temporal de los cambios de proteínas pertenecientes a categorías implicadas en la maquinaria de síntesis, plegamiento y renovación de proteínas. Todas ellas forman parte de complejos proteicos descritos. Aunque no está claro qué isoforma específica de histona interaccionan entre sí para formar parte del nucleosoma, representamos todas ellas como complejo puesto, que es bien conocido que 8 de ellas (dos copias de cada proteína histónica, H2A, H2B, H3 y H4) se unen para formar el núcleo del nucleosoma [215]. Además, las proteínas anotadas como “Sm-like ribonucleoproteins” son proteínas realmente provenientes de tres complejos distintos LSM1-7, LSM2-8 y SMN [216, 217] y todos ellos forman parte del espliceosoma. **(B)** Evolución temporal de los cambios de categorías mostrados en A. Por razones de representación, el valor Z_{ca} de las categorías se representa con signo negativo. **(C)** Distribución de las cuantificaciones estandarizadas de proteínas (Z_{qa}) pertenecientes a las categorías indicadas en la leyenda de B, mostrando cambios de proteína coordinados.

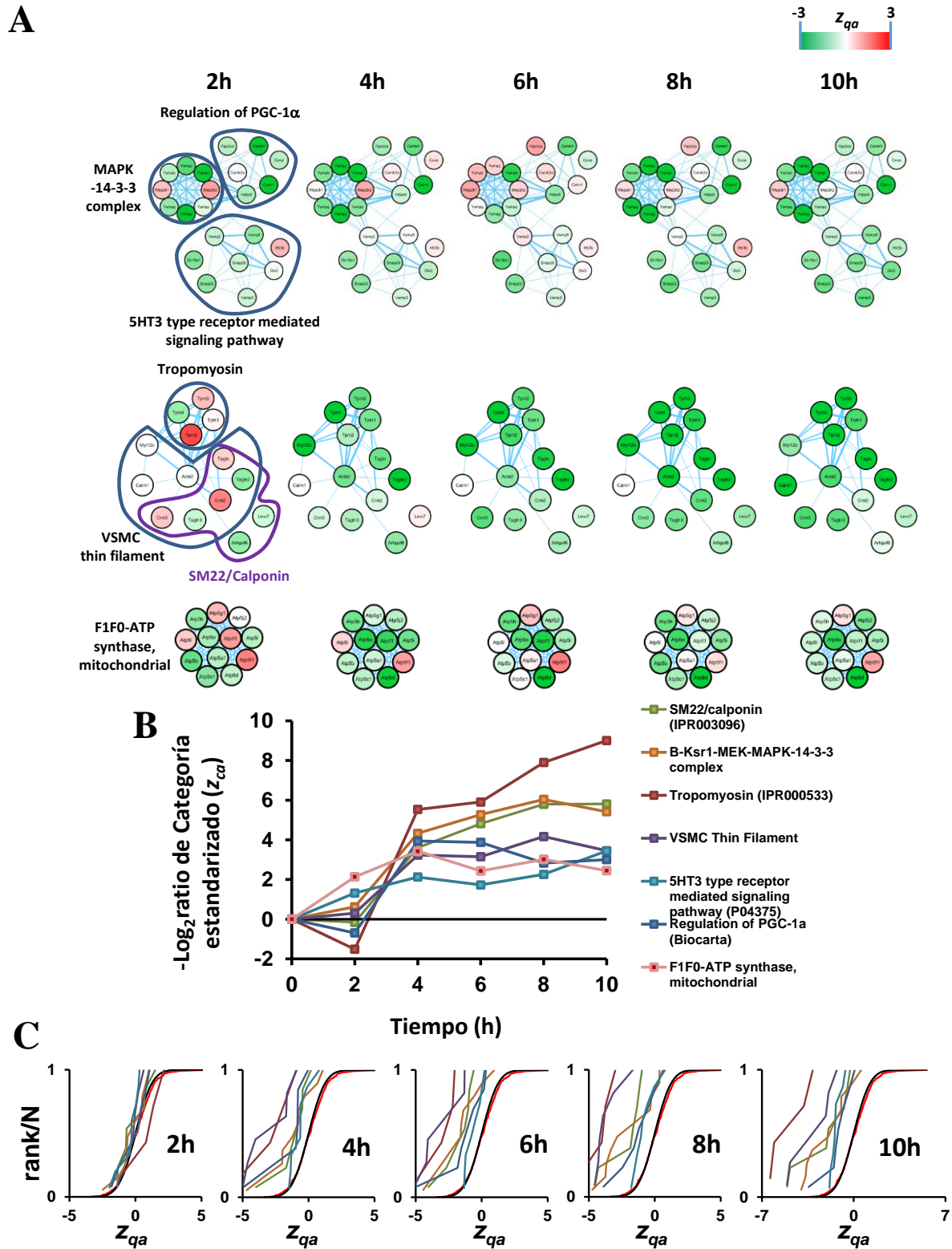


Figura 8. Evidencias de cambios de proteína coordinados consistentes con el fenotipo contráctil de VSMC debido a la estimulación con AngII. (A), (B) y (C) tienen el mismo significado que en la Figura 7. Los complejos de proteínas conocidas se representan como en la Figura 7; el resto de proteínas se representan como redes de interacción de acuerdo a STRING.

observamos un incremento en la abundancia de las proteínas de la mayoría de los componentes de la ATP sintasa mitocondrial. De manera interesante, un análisis de interacción usando STRING reveló que todos estos grupos de proteínas forman unas redes altamente interconectadas, ocasiones juntan varias de estas categorías (Figura 8). Este conjunto de interacciones físicas y funcionales puede ser presumiblemente la causa de su alto grado de coordinación entre las proteínas de todas estas categorías, y una explicación de porqué estas categorías están siendo capturadas por el modelo SBT.

1.5. ANGIOINDUCE ALTERACIONES COORDINADAS DE PROTEÍNAS QUE SON REFLEJO DE LA MIGRACIÓN, LA REPRESIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y SECRECIÓN

Un grupo adicional de categorías coordinadas fueron relacionadas con la inducción de la migración en VSMC (Figura 9), entre las cuales tenemos proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa y las proteínas ARF/SAR ambas inducidas por AngII. Las RhoGTPasas actúan como mecanismo primario de sensibilización frente a Ca^{2+} en músculo liso, incrementando la respuesta contráctil de estas células [218], y participando en la formación de adhesiones focales, las cuales son importantes para la migración celular [219, 220]. La categoría ARF/SAR abarca a los factores de ribosilación de ADP y proteínas de secreción asociadas a Ras, que principalmente regulan el tráfico vesicular [221]. Estas pequeñas GTPasas activadas por AngII también han sido implicadas en la promoción de la migración en neuronas y células epiteliales [222, 223].

Encontramos por otra parte evidencias adicionales hacia el fenotipo migratorio como la regulación positiva coordinada que observamos en las proteínas del complejo Arp2/3 y las proteínas de la categoría reguladores *upstream* de MAP3K1. El primer grupo es un componente clásico de los podosomas formados en las propias células de músculo liso durante la migración [224], mientras que el otro contiene entre otras, la tenascina, una glucoproteína que proporciona propiedades antiadhesivas a las células, permitiendo el movimiento celular [225], y la trombospodina-1, un potente estimulador de la migración de VSMC [226]. Finalmente, los colágenos fibrilares, cuya función principal es formar parte de una barrera mecánica que pudiera prevenir la migración celular [227], están en consecuencia disminuidos.

Por otra parte, las seis proteínas de más respuesta a AngII de la categoría ARF/SAR son activadas por un factor de transcripción común el PAX-4a (de acuerdo con la base de datos de factores de transcripción de Qiagen), mientras que el resto de las proteínas de categorías forman complejos o redes interconectadas de alta densidad, en este caso es la presencia de un nodo común lo que explicaría su detección por el modelo SBT por su comportamiento coordinado.

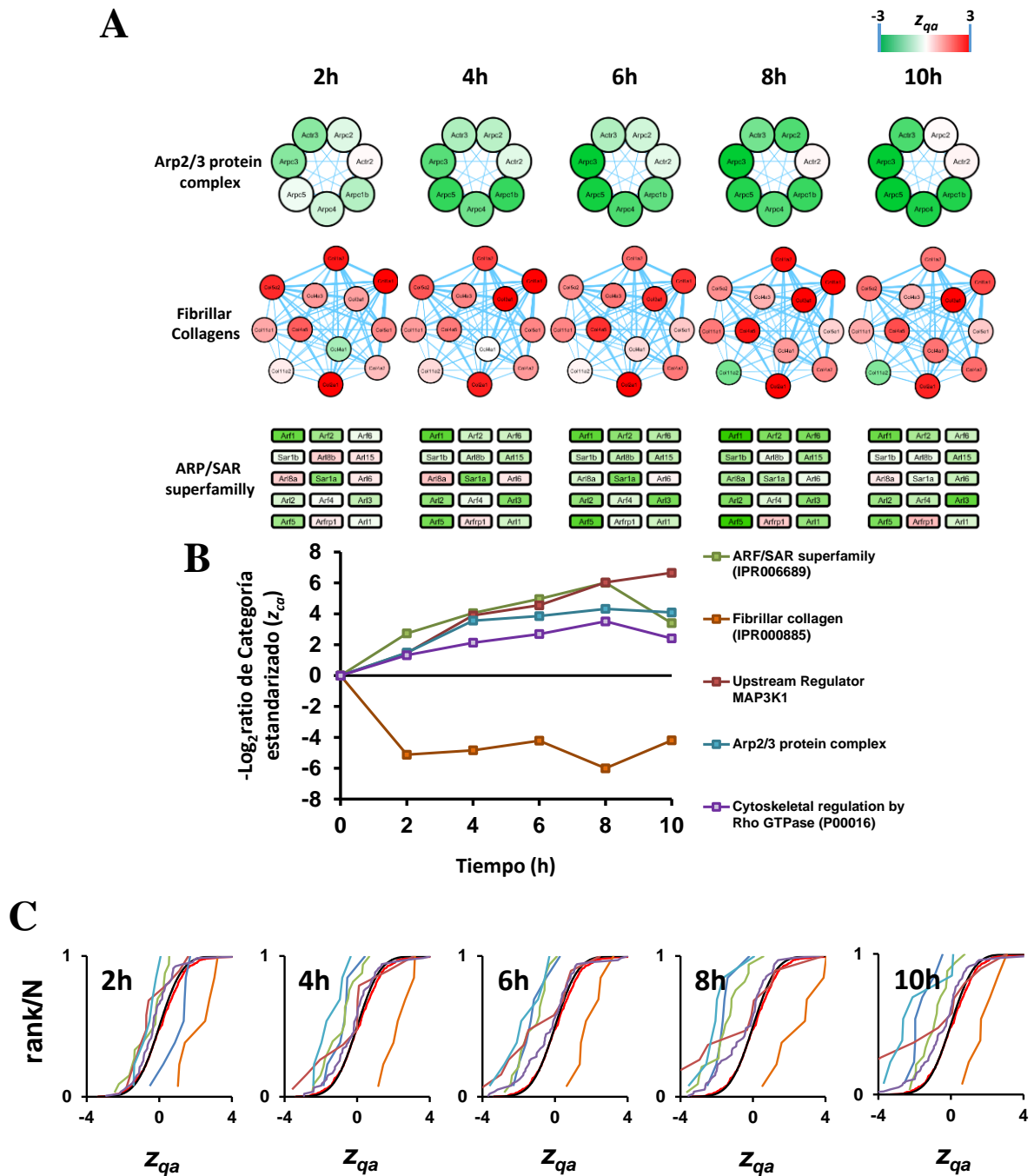


Figura 9. AngII induce alteraciones coordinadas en las proteínas reflejando migración. (A), (B) y (C) tienen el mismo significado que en la Figura 7. Las proteínas que no forman ni complejos conocidos ni redes de interacción según STRING son representadas como cuadrados.

Finalmente, detectamos alteraciones coordinadas en varias categorías que indican la represión de la proliferación y la secreción (Figura 10). Así, el complejo de ATPasas dependientes de DNA MCM, compuesto por 6 proteínas en eucariotas (MCM2 a 7), el cual es requerido para la iniciación de la replicación de los cromosomas [228, 229]; y la categoría glutamina amidotransferasa, que contiene mayoritariamente enzimas clave en la utilización de glutamina para la síntesis de RNA y DNA [230], son ambas reprimidas con el tratamiento con AngII. De manera similar, la biosíntesis de homocisteína también se

detecta disminuida; esta ruta, conocida por la promoción de la proliferación de las células de músculo liso [231], es también una importante ruta para la metilación del DNA [232, 233], mRNA [232] e histonas [234, 235]. Esta reacción de metilación es catalizada en parte por la familia de las arginina-metil-transferasas (*Prmt*), entre los que detectamos 4 miembros reprimidos (Figura 10). Ya que, como norma general, la metilación de histonas promueve el empaquetamiento del DNA alrededor de los nucleosomas, resultando en la formación de heterocromatina y la represión de la expresión génica [236], la represión de esta ruta podría promover un empaquetamiento más relajado de los nucleosomas, que estaría de acuerdo con los aumentos observados en la abundancia de histonas (Figura 7).

La ruta del complemento, conocida por ser iniciadora de la inflamación [237] y el cambio fenotípico de VSMC a proliferativo - secretor [238], está también reprimida. Además, las enzimas antioxidantes y la gluconeogénesis fue encontrada aumentada de manera coordinada. El incremento de las enzimas antioxidantes es reflejo de la activación de un mecanismo de defensa que intenta contrarrestar el descrito efecto que tiene la AngII de promover el estrés oxidativo en VSMC [239], induciendo la proliferación celular [240, 241]. De manera similar, el aumento coordinado de la gluconeogénesis, que es detectado junto con una concomitante represión de las enzimas glucolíticas (Figura 10), es consistente con el hecho de que las VSMC son altamente glucolíticas en su estado proliferativo [242].

Además, observamos que aparte de las proteínas de MCM, que fueron detectadas en CORUM como complejo, prácticamente todas las proteínas que se mencionan en este apartado que pertenecen a una misma categoría son reguladas por un factor de transcripción común. Así, las enzimas más sensibles de la ruta de la homocisteína aumentan por el factor de transcripción NF- κ B [243], el cual juega un papel clave en la mediación que AngII dirige hacia la proliferación y la migración celular [244]. De manera similar, los genes del sistema del complemento comparten reguladores transcripcionales comunes como IL-1, IL-6 e interferón gamma, entre otras [245], y las enzimas antioxidantes se regulan a través de elementos de respuesta antioxidante [246, 247] reconocidos por el factor nuclear (erythroid-derived 2)-like 2 (*Nrf2*) [248].

En contraste con otros tipos celulares, dónde la gluconeogénesis es localizada en el citosol, en VSMC estas enzimas están físicamente confinadas en la membrana plasmática en microdominios [249, 250], y comparten factores de transcripción comunes que las activan como un coactivador transcripcional (*CREB-regulated transcription coactivator 2*) y el receptor de glucocorticoides entre otros [251]. Tomados en su conjunto, todos estos resultados revelan que la gran mayoría de las categorías coordinadas descubiertas por el modelo SBT incluyen proteínas que comparten interconexiones físicas y/o funcionales o mecanismos de regulación comunes.

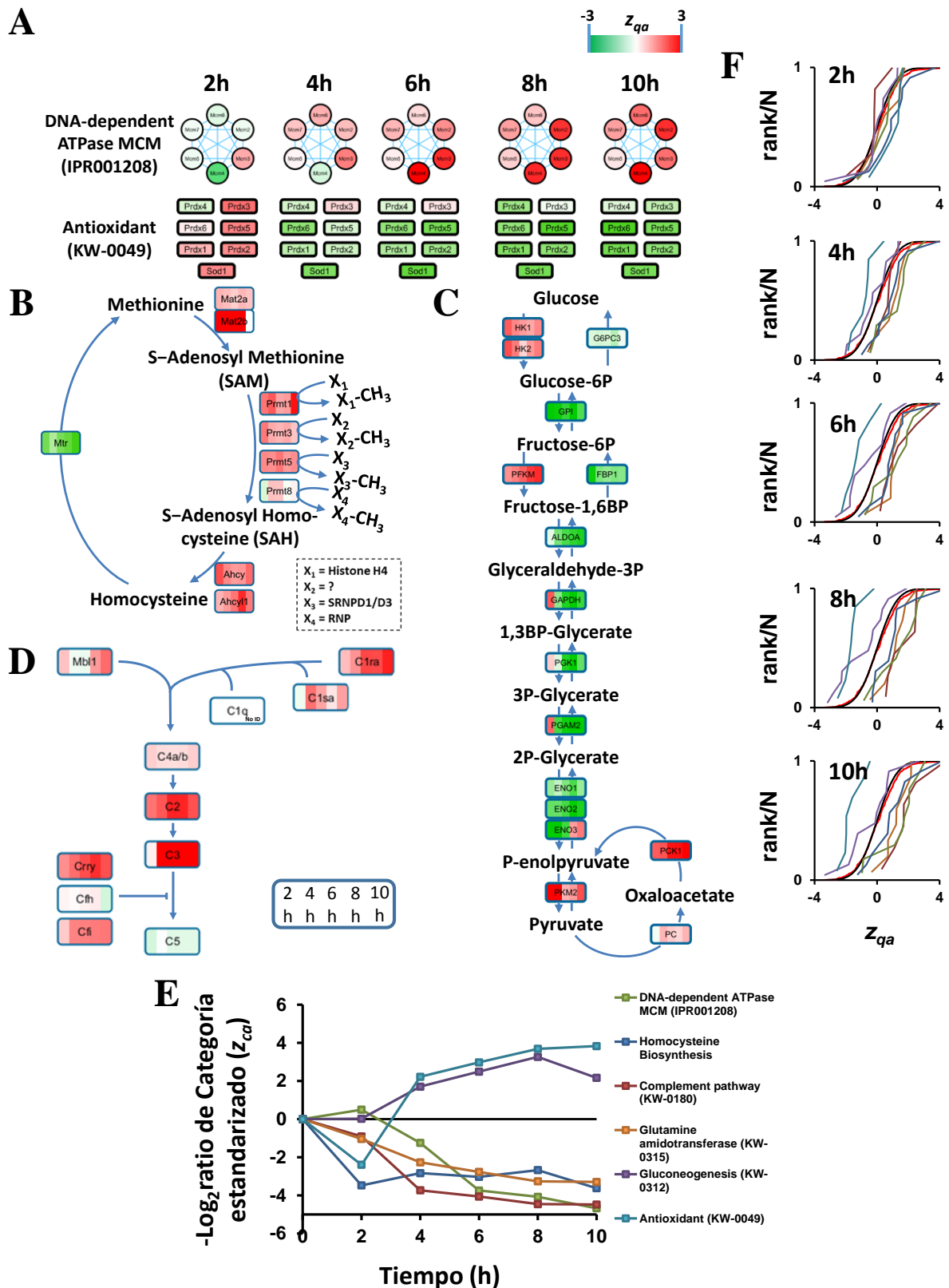


Figura 10. AngII promueve coordinadamente alteraciones que se reflejan en la represión de la proliferación celular y la secreción en VSMC. (A), (E) y (F) tienen el mismo significado que en la Figura 7. (B), (C) y (D) Representación esquemática de los cambios de proteína en la biosíntesis de homocisteína, gluconeogénesis y ruta del complemento, respectivamente. Cada proteína se muestra en un cuadrado coloreado, en el que cada banda representa la cuantificación estandarizada de cada proteína a un tiempo de estimulación.

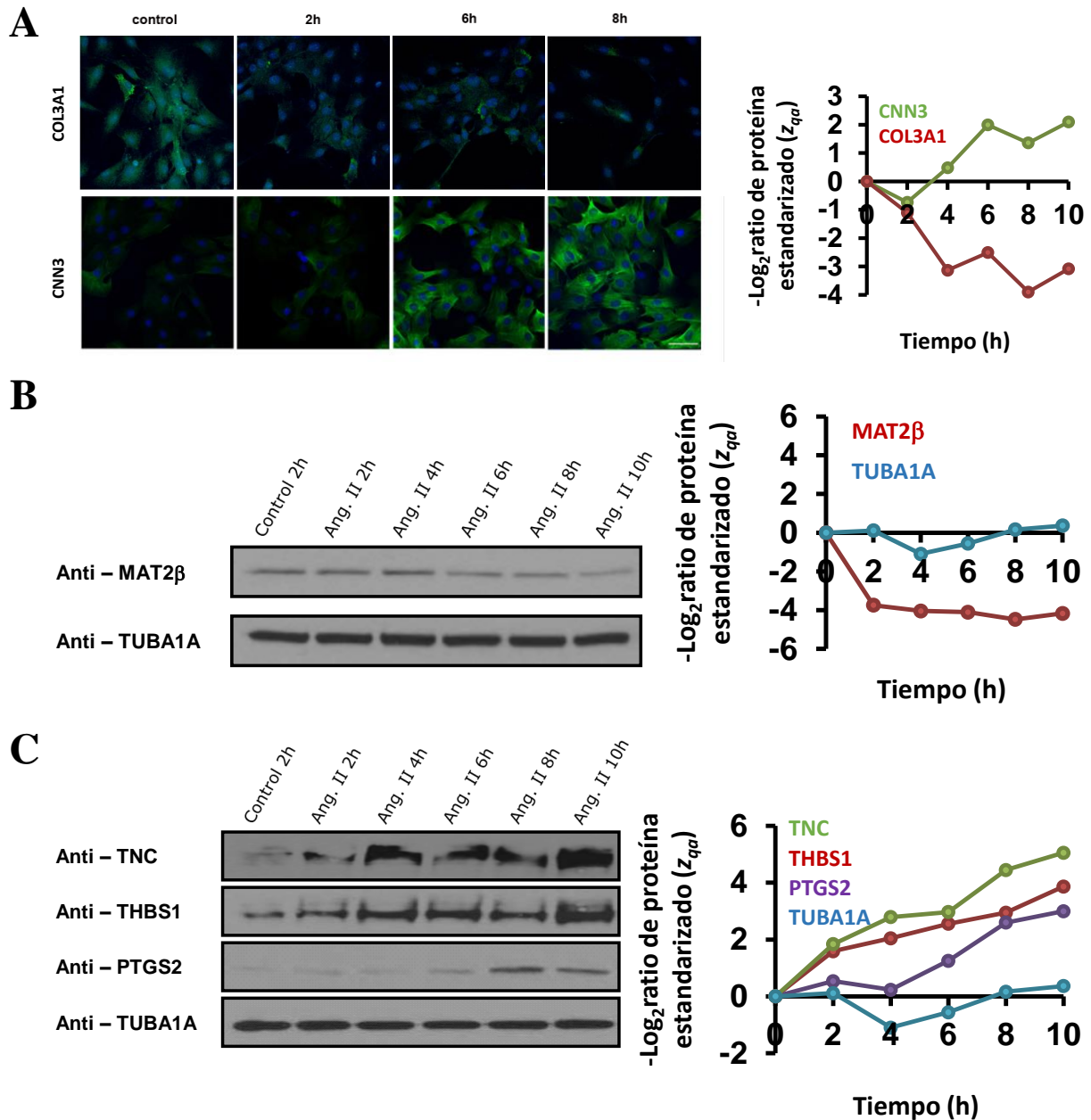


Figura 11. Validación de los resultados obtenidos mediante el análisis por biología de sistemas. (A) Inmunotinción representativa de colágeno III alfa 1 (COL3A1) y calponina (CNN) de VSMC tratadas con AngII durante 2, 6 y 8 horas. Escala, 50µm. **(B)** y **(C)** Inmunoblots mostrando la reducción de la metionina adenosiltransferasa II β (MAT2β) y el aumento de tenascina (TNC), trombospondina-1 (THBS1) y prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (PTGS2) mediado por AngII durante el tiempo. Tubulina-α (TUBA1A) se usó como control de carga. En **(A)**, **(B)** y **(C)**, se indica el transcurso temporal de la cuantificación de proteínas en términos de la variable estandarizada (Z_{qa}) cambiada de signo para facilitar la interpretación.

Finalmente, la adquisición de este fenotipo contráctil, no proliferativo y migratorio por VSMC debido al tratamiento con AngII en el tiempo de análisis fue confirmado mediante otras aproximaciones adicionales. Se detectaron mediante inmunofluorescencia niveles disminuidos de colágeno III alfa 1 (Figura 11, A, parte superior) y niveles incrementados de la preteína contráctil calponina 3 (Figura 11, A, parte inferior), así como niveles reducidos de MAT2β, la enzima reguladora clave de la ruta de biosíntesis de

homocisteína que promueve la proliferación de las células de musculo liso (Figura 11, B). Además, otros factores sensibles a AngII en este tipo de células, implicados en procesos de migración tales como la tenascina y la trombospondina-1 [252-254] mostraban altos niveles de expresión en los inmunoblot (Figura 11, C).

1.6. LAS PROTEÍNAS *OUTLIER* MANTIENEN SU COMPORTAMIENTO NO COORDINADO EN EL TIEMPO Y TIENDEN A JUGAR PAPELES FUNCIONALMENTE DIFERENCIALES

Las alteraciones en las categorías funcionales detectadas por nuestro modelo no se ven afectadas por la presencia de proteínas aisladas (con valores cuantitativos atípicos u *outliers*) que muestran cambios extremos en su abundancia, ya que estos *outliers* no son tenidos en cuenta en la medida del comportamiento de las categorías. Esto abre el debate acerca de si estas proteínas tienen papeles biológicos específicos que puedan estar explicando su comportamiento anómalo. Para analizar esta cuestión primero estudiamos los cambios de proteínas individuales y filtramos quitando aquellas proteínas que pertenecían a categorías que cambian (como las mencionadas en el apartado anterior) (Figura 12). Cabe destacar, que las proteínas restantes (es decir, proteínas que actúan independientemente de su categoría) fueron detectadas ya a las 2h de tratamiento, mientras que la coordinación no fue detectable hasta las 4h (comparar con Figura 5, C). Además, estas proteínas independientes mantienen su comportamiento consistente a lo largo del tiempo, mostrando en todos los casos un comportamiento muy similar al que se obtiene a las 6h (Figura 12, B y C). Por tanto, parece que las proteínas *outlier* responden al estímulo de manera diferente a las proteínas que siguen el patrón coordinado.

En un segundo análisis inspeccionamos la naturaleza de las 24 proteínas *outliers* que pertenecen a las 25 categorías alteradas por AngII en al menos un tiempo (Tabla Suplementaria 1). Curiosamente, algunos de ellos lo eran en una categoría pero no en otras, o formaban un subconjunto de proteínas con una clara funcionalidad separada, lo que sugeriría una clasificación inapropiada. Este fue el caso de algunos colágenos y proteínas musculares (Tabla Suplementaria 2 y Figura 13, B). Dentro de las proteínas restantes, cabe destacar los casos de la PROF1 y PROF2, las cuales eran *outliers* opuestos en la misma categoría. Se sabe que estas dos proteínas están diferencialmente reguladas; así, la PROF1, que ha sido descrita como promotora de la motilidad celular está aumentada, mientras que la PROF2 que actúa como supresor de la misma se encuentra disminuida [255]. Nosotros vemos cómo la proteína promotora aumenta mientras que la supresora de la motilidad disminuye (Figura 13, A, parte superior). Otro *outlier*, la MYH10, asignada a esta misma categoría, es una cadena pesada de miosina no muscular, conocida por funciones especializadas en citoquinesis, concentrada en microprolongaciones citoplasmáticas en el frente de los filopodios y en las fibras de retracción [256-258].

Curiosamente, vemos como la MYH9, otra proteína de esta categoría que aunque no sea *outlier*, sí que ha sido descrita como importante en la migración de VSMC [259], tiene un patrón temporal similar al de la MYH10 (Figura 13, A, parte inferior). De manera similar, la fosfoproteína ribosomal P0 (RPLP0), es el único *outlier* detectado en la categoría de proteínas ribosomales 60S que ha sido descrito como componente de diferentes complejos proteicos con otras proteínas citosólicas como GRAP2 y proteína de interacción a ciclina D [260], además de ciertas funciones extraribosomales que tiene en su forma libre [261]. Finalmente, otro tipo de *outlier* los componen proteínas como PAI-1, que cambian en el mismo sentido que su categoría, en este caso es bien conocido al tratarse de uno de los mediadores principales del efecto de AngII en VSMC [262], por lo que es de esperar su alta abundancia. Todos estos resultados indican que los *outliers* detectados por el modelo corresponden a proteínas que bien están incorrectamente clasificadas o juegan papeles específicos que difieren del resto de proteínas de determinada categoría.

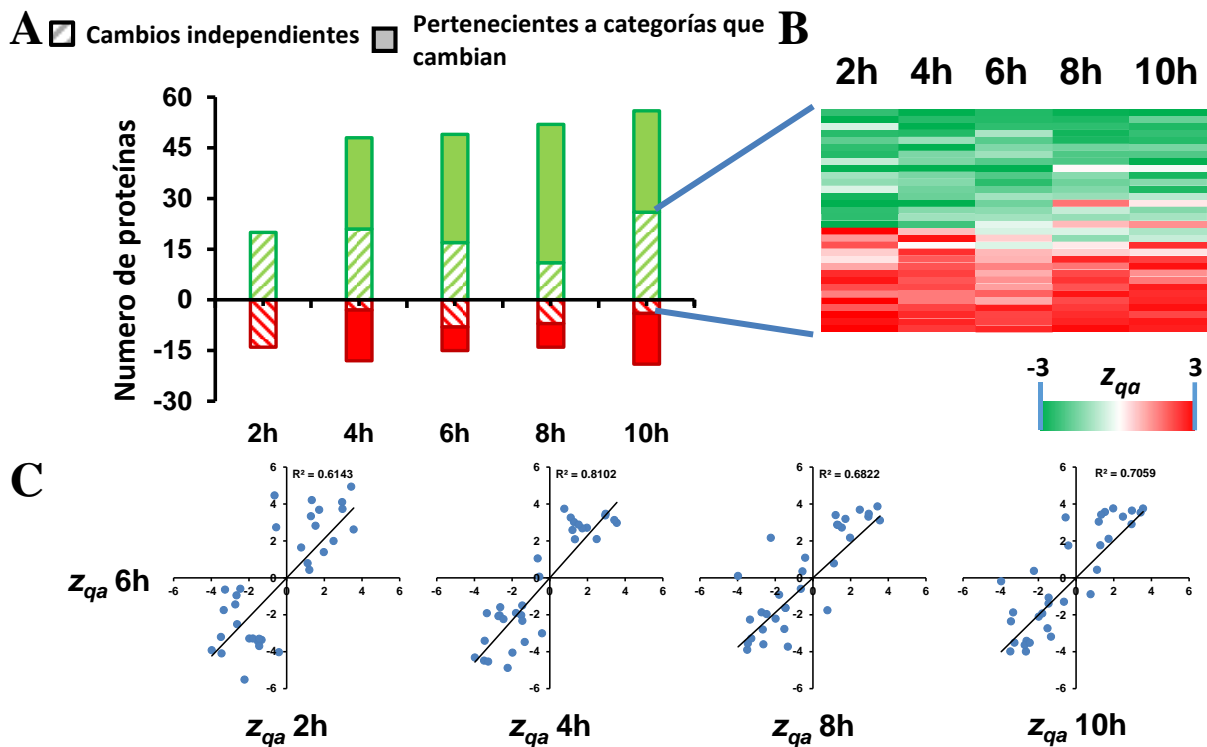


Figura 12. Análisis de las proteínas *outlier* a lo largo del tiempo con el tratamiento de AngII. (A) Evolución temporal del número de proteínas que cambian pertenecientes (barras llenas) o no (cambios independientes) (barras rayadas) a categorías que cambian de manera coordinada. **(B)** Mapa de calor mostrando la evolución temporal de cuantificación en términos de Z_{qa} de las proteínas que cambian significativamente ($FDR_{qa} < 5\%$) de manera independiente en al menos un tiempo de análisis. Las magnitudes de la variable estandarizada se colorean en función de la escala de color de la parte inferior. **(C)** Análisis de correlación entre la cuantificación de las proteínas que cambian de manera independiente a los diferentes tiempos de análisis comparado con 6h de tratamiento con AngII.

Finalmente, en un tercer análisis, inspeccionamos las proteínas independientes. De estas, seleccionamos un subconjunto de 21 proteínas de alta respuesta (Tabla Suplementaria 3). La mayoría de estas proteínas han sido relacionadas por jugar un papel

relevante en señalización celular, migración y proliferación, pero ninguna de ellas había sido descrita antes por ser regulada por AngII en VSMC. Es decir, todos nuestros resultados proporcionan un compendio de evidencias sobre que las proteínas *outliers* detectadas por el modelo SBT son proteínas que tienen comportamientos independientes, de nuevo, probablemente debido a su implicación en papeles funcionales específicos que son diferentes al resto de proteínas que tienen un comportamiento coordinado.

Resumidamente podemos decir que algunas de las proteínas que hemos ido describiendo a lo largo de los resultados como afectadas por AngII habían sido previamente observadas como sensibles a AngII en músculo liso y otros tipos celulares, incluyendo la calponina [263], proteínas contráctiles [264], proteínas pequeñas de unión a GTP [265], proteínas quinasa asociadas a Rho [266], MAP quinasas [267-269] e histonas [270-273]. Sin embargo, la gran mayoría de las proteínas detectadas en nuestro estudio como implicadas en la acción coordinada de AngII no habían sido descritas previamente, y todo ello en su conjunto proporciona la primera imagen global de las alteraciones fenotípicas tempranas inducidas por el tratamiento con AngII que tienen lugar en VSMC.

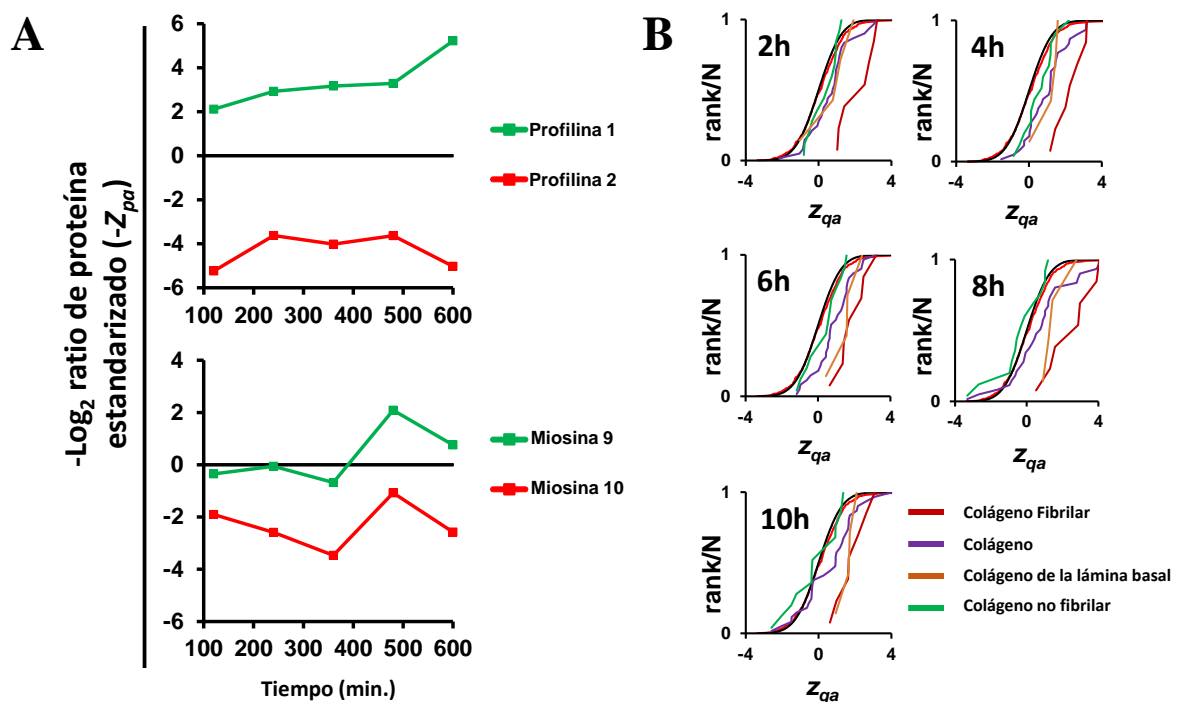


Figura 13. Análisis detallado de los *outliers* de categoría relacionadas con la migración celular y Reclasificación de las isoformas de colágeno en nuevas categorías funcionales en VSMC tratadas con AngII. (A) Evolución temporal de las cuantificaciones de las proteínas indicadas, expresadas en unidades de -log₂ ratio estandarizado (-Z_{pa}). **(B)** Distribución de la cuantificación de proteínas estandarizadas (Z_{qa}) pertenecientes a las categorías de colágeno obtenidas manualmente mencionadas en la leyenda. La categoría colágeno general (KW-0176) contiene varios outliers que están aumentando (CO10A1, CO8A1, marcadas en negro en la Tabla Suplementaria 1), que contrastan con el resto de los colágenos, son isoformas de colágeno no fibrilares conocidas por formar estructuras porosas de baja densidad de colágeno que podría estar facilitando la migración celular [274, 275]. Por tanto, creamos manualmente una nueva categoría que contiene tan solo las isoformas fibrilares (Tabla Suplementaria 2), la que suponemos que genera una barrera que prevendría de la migración celular [227], la cual está claramente reducida de manera coordinada.

El incremento en la síntesis de proteínas, en la maquinaria de plegamiento y la renovación sugiere la inducción de un fenotipo hipertrófico donde por primera vez observamos la capacidad de la AngII de activar las subunidades del esplicesoma y la prefoldina. Este fenotipo es consistente con el observado refuerzo en la contractilidad y migración, donde describimos el efecto de la AngII como activador de la ruta de señalización mediada por receptores de tipo 5HT₃, el complejo V de la cadena transportadora de electrones y las proteínas del complejo Arp2/3. La disminución de colágeno fibrilar durante las etapas tempranas de la activación de AngII también es algo novedoso puesto que tiene el sentido opuesto a lo observado con tiempos de incubación más altos (48h) [276]. Finalmente, también detectamos una represión general de la proliferación y de categorías secretoras, incluyendo el complejo MCM, las glutamina amidotransferasa, el complemento, la gluconeogenesis y la biosíntesis de homocisteína, las cuales nunca habían sido observadas como reprimidas por AngII en VSMC. Estos resultados por tanto, sugieren que a tiempos cortos AngII induce la migración e inhibe la proliferación en VSMC, al contrario de lo que se puede extraer de la literatura [12], si bien aquellos análisis se hicieron a tiempos de tratamiento mucho más largos (48h) y en nuestra opinión el aumento de la proliferación podría no deberse a la acción directa de AngII. Esta caracterización de nuevas rutas de señalización y efectores moleculares regulados por AngII en VSMC durante las fases de respuesta temprana podría facilitar la identificación de dianas terapéuticas para la intervención en muchas enfermedades cardiovasculares que ocurren con remodelado de la pared vascular.

2. Desarrollo y aplicación de nuevas aproximaciones de adquisición de datos mediante DiS

2.1. CÁLCULO DE LA TASA DE ERROR DE IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS PROVENIENTES DE DiS

La identificación de los péptidos provenientes tanto de adquisición dependiente como independiente de intensidad, DdS y DiS, respectivamente, se realizó usando el algoritmo SEQUEST en Proteome Discoverer 1.4. A diferencia de las búsquedas hechas para datos adquiridos mediante DdS, en los experimentos DiS no disponemos de la información de la masa de los iones precursoros ni la carga. Por tanto, hay que permitir al motor de búsqueda que trate de identificar cada uno de los péptidos de la digestión triptica *in silico* de la base de datos con cargas +2, +3 y +4 de manera secuencial.

La validación de las identificaciones de los datos procedentes de la adquisición mediante el método DiS, puede realizarse siguiendo una estrategia general, en la que los archivos de datos crudos de espectros de fragmentación se buscan contra una base de datos del proteoma de referencia (directa o "Target") de la especie que se está analizando

y la misma colección de espectros MS/MS se busca frente a una base de datos pseudoinvertida (invertida o "Decoy") construida a partir de la respectiva base de datos de referencia con los parámetros comentados en Materiales y Métodos. Sin embargo, en este caso, no se puede tener cuenta para la puntuación de la bondad de identificación parámetros o puntuaciones dependientes como el ΔC_n o $pRatio$. Puntuaciones que determinan la bondad de la identificación para un determinado espectro de fragmentación, teniendo en cuenta variables ajenas al candidato y al espectro experimental. Puesto que en este método de adquisición, al no centrarse en el precursor la ventana de aislamiento, se favorece la fragmentación de más de un péptido por espectro y considerar segundos candidatos o distribuciones de los mismos no sería correcto.

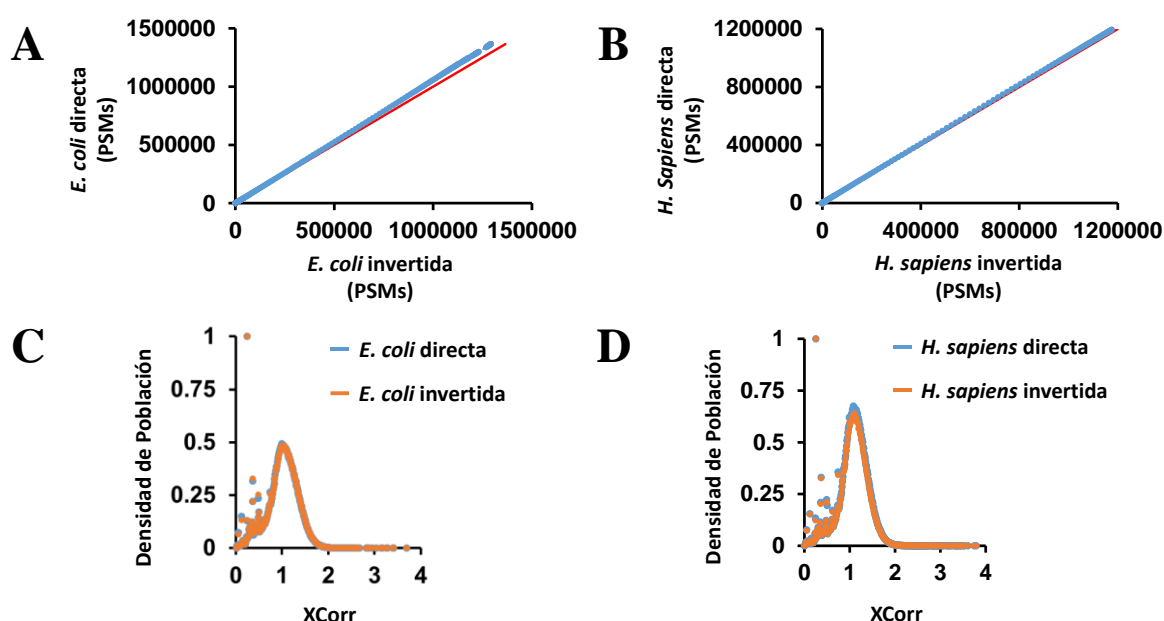


Figura 14. Exactitud de las estimaciones decoy. (A) Número de PSMs obtenidos de la búsqueda MS² humana frente a una base de datos de *E. coli* *target* y *decoy* para diferentes umbrales de XCorr. (B) Número de PSMs obtenidos de la búsqueda MS² *E. coli* frente a una base de datos de *H. sapiens* *target* y *decoy* para diferentes umbrales de XCorr. (C) y (D) Distribución de la población de PSMs con respecto de los XCorr de las búsquedas en base de datos directa (azul) e invertida (naranja) de *E. coli* y *H. sapiens*, respectivamente.

Debido a las características propias de la adquisición de datos independiente de intensidad se pueden aplicar además de la estrategia anterior para el cálculo de la tasa de error, FDR; una estrategia análoga más propia de métodos dirigidos, que consistiría en enfrentar una colección de secuencias frente a colecciones de espectros de fragmentación. Para la correcta aplicación de ambas estrategias, es necesario demostrar que el emparejamiento o *matching* de las secuencias *target* o *decoy* con la colección de espectros se produce de manera aleatoria sin sesgos hacia la colección de espectros *target* o *decoy*, tal y como se produce en DdS si se utiliza un número determinado de precursores [192]. Para demostrar la validez de la estrategia *target/decoy* para analizar los datos procedentes de DiS, planteamos un pequeño experimento, que consistió en analizar una colección de

espectros de fragmentación *target* (MS_{T^2}) frente a dos bases de datos *decoy*. Una base de datos *target* de una especie lejana y con relativa poca homología y la misma base de datos *decoy*. Es decir, analizamos carreras cromatográficas analizadas mediante DiS de péptidos trípticos de extractos de *E. coli* y las buscamos frente a base de datos de *H. sapiens* (directa e invertida) y de péptidos trípticos de extractos de Hela (*H. sapiens*) y las buscamos frente a base de datos de *E. coli* (directa e invertida).

En la Figura 14, A y B, contamos todos los posibles emparejamientos de péptidos y espectros positivos (PSMs) para un determinado corte de XCorr para ambas búsquedas (A) MS_{T^2} *H. sapiens* frente a *E. coli* directa e invertida y (B) MS_{T^2} *E. coli* frente a *H. sapiens* directa e invertida y observamos que son rectas de pendiente 1. Es decir, el número de PSMs para un determinado XCorr es igual en ambas bases de datos *decoy* o lo que es lo mismo, la probabilidad de que por azar un péptido aleatorio nos dé una puntuación alta de XCorr, es muy baja. Además, la distribución de la densidad de población de PSMs frente al XCorr (Figura 14, C y D) es igual para ambos casos.

Con esto demostramos que la estrategia para el cálculo de la FDR basada en búsquedas *target* y *decoy* para datos provenientes de DiS es válida.

2.2. MEJORA DE LAS PRESTACIONES EN ADQUISICIÓN POR DiS

Para comparar las prestaciones de las metodologías dependiente e independientes de intensidad, DdS y DiS, analizamos la misma cantidad de péptidos trípticos (5 μ g) provenientes de un extracto de células Hela analizando, en dos rangos de masas para ambos métodos de adquisición, uno de 400 a 750 y otro de 750 a 1100 Th. Realizamos la búsqueda frente a la misma base de datos (*Uniprot 08062012*) con los mismos parámetros de búsqueda y controlamos la tasa de error de las identificaciones utilizando el mismo algoritmo implementado en DXtractor. En una primera comparativa vemos que existe tan solo un 39% de solapamiento entre ambos métodos (Figura 15, A), con aproximadamente un 30% más de identificaciones en DiS que en DdS. Algo que nos sorprendió *a priori* sobre todo por la presencia de 5974 péptidos únicos identificados tan solo en el análisis mediante adquisición DdS ($FDR_{cp} < 5\%$). Por este motivo hicimos una nueva búsqueda utilizando como base de datos la lista de péptidos únicos identificados en tan solo uno de los métodos de adquisición (DiS o DdS). Y validamos aquellos que se encontraban en una ventana de tiempo de retención en columna de ± 2 min de la carrera de un método contra la del otro (Figura 15, B y C). De esta manera obtuvimos unos resultados definitivos en los que DiS supera en un 24,8% la profundidad de análisis de DdS (Figura 15, E) y en los que la identidad de los péptidos únicos tan solo identificados en el método convencional supone menos de un 5%, lo que estaría explicado en parte por el corte de FDR_{cp} al 5% (Figura 15, D). En cuando a los péptidos recuperados podemos observar que presentaban un valor mínimo de SpScore de 112 y 105,4 para DiS y para DdS, respectivamente, lo que vuelve

a indicar que este tipo de aproximación para recuperar información adicional que el motor de búsqueda no puede extraer en la primera búsqueda es correcta y las identificaciones son fiables.

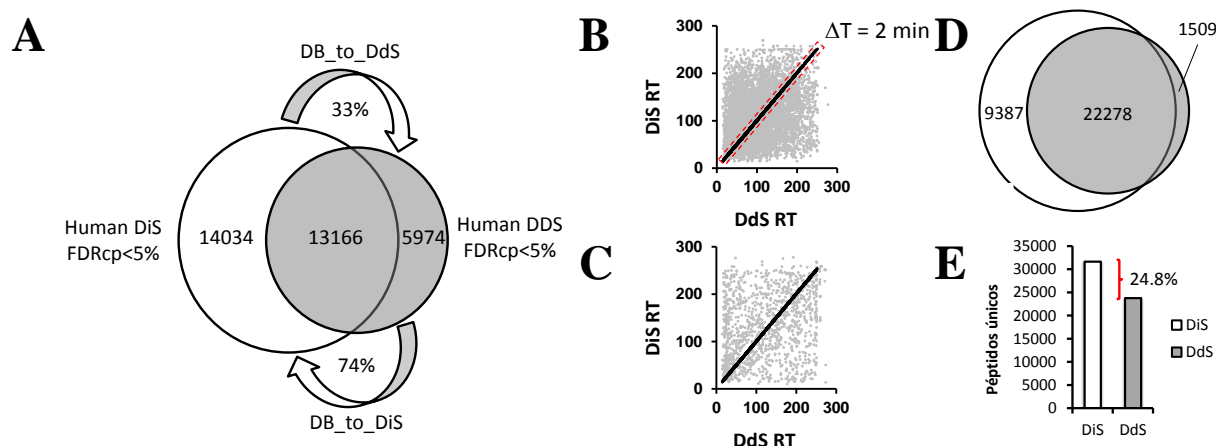


Figura 15. Mejora de la sensibilidad del DiS frente al DdS. (A) Diagrama de Venn de los resultados de identificación a FDRcp < 5%. (B) Dispersión de los tiempos de retención de los péptidos identificados en DiS y no en DdS en ambos modos. (C) Dispersión de los tiempos de retención de los péptidos identificados en DdS y no en DiS en ambos modos. Resultados finales de la comparativa entre los dos modos de adquisición, en forma de (D) diagrama de Venn y (E) diagrama de barras.

2.3. EL Q-SCORE UN PARÁMETRO CUANTITATIVO PARA DiS

El *Q-Score* o la suma de las intensidades de los fragmentos que coinciden en masa/carga de un candidato para un espectro dado con una tolerancia de 0,01 Da puede ser utilizado como parámetro cuantitativo de DiS. Para determinar la aplicabilidad de dicho parámetro, realizamos un pequeño experimento en el cual añadimos cantidades conocidas (5, 25, 100, 500, 2000 y 4000 pg) de seis péptidos AQUA en los que se encontraban marcadas lisinas y argininas (R (6 ^{13}C y 4 ^{14}N) y K (6 ^{13}C y 2 ^{14}N)) a un fondo de un proteoma complejo, lisado de células Hela, cargando en columna 5 μg totales. Las analizamos en Q-Exactive aplicando un método DiS en el que tan solo adquirimos el primer rango de masa (400 a 750 Th) debido a que en este rango se encontraban los seis péptidos añadidos. Posteriormente hicimos las búsquedas con una versión modificada del motor de búsqueda Comet [199] (Comet-q) en el que además de sacarnos los parámetros estándar de una búsqueda convencional nos calcula automáticamente el *Q-Score* de los 10 péptido candidatos con mejor XCorr, de esta manera obtenemos de manera automática, una traza de *Q-Score* a lo largo de toda la carrera cromatográfica, como se muestra a modo de ejemplo en la Figura 16.

La traza cuantitativa del *Q-Score* es muy similar al cromatograma extraído de un ión (*XIC*, *eXtracted Ion Chromatogram*) para un determinado péptido, aunque tenemos que hacer una serie de consideraciones al aplicar nuestro método. Cuando la cantidad de péptido es suficiente, a partir de 25 pg, no observamos en ningún caso, diferencias entre

la cuantificación utilizando el máximo del *Q-Score* o la suma de todos los *Q-Score* que se calculen de un péptido durante toda la carrera cromatográfica. Sin embargo, a cantidades bajas, es importante asegurar la identificación del péptido entre las distintas carreras. Para ello añadimos al método una dimensión adicional, el tiempo de retención del péptido en la carrera cuya intensidad sea la máxima y por tanto la más fiable, con una tolerancia de ± 1 min. De esta manera, evitamos, como se puede observar en el ejemplo, que un péptido añadido a una cantidad de 5 pg, pudiese dar una señal superior al de la muestra en que añadimos 25 pg del mismo. Ya que el péptido SATYVNTEGR que en nuestro sistema cromatográfico se eluye con un tiempo de retención de 26,1 min., nos hubiera dado bien una señal más alta de la que le correspondería, si hubiéramos utilizado el máximo de la traza. O bien una señal más alta que el siguiente punto (25 pg) si hubiéramos utilizado el sumatorio de la traza del *Q-Score* a lo largo de toda la carrera.

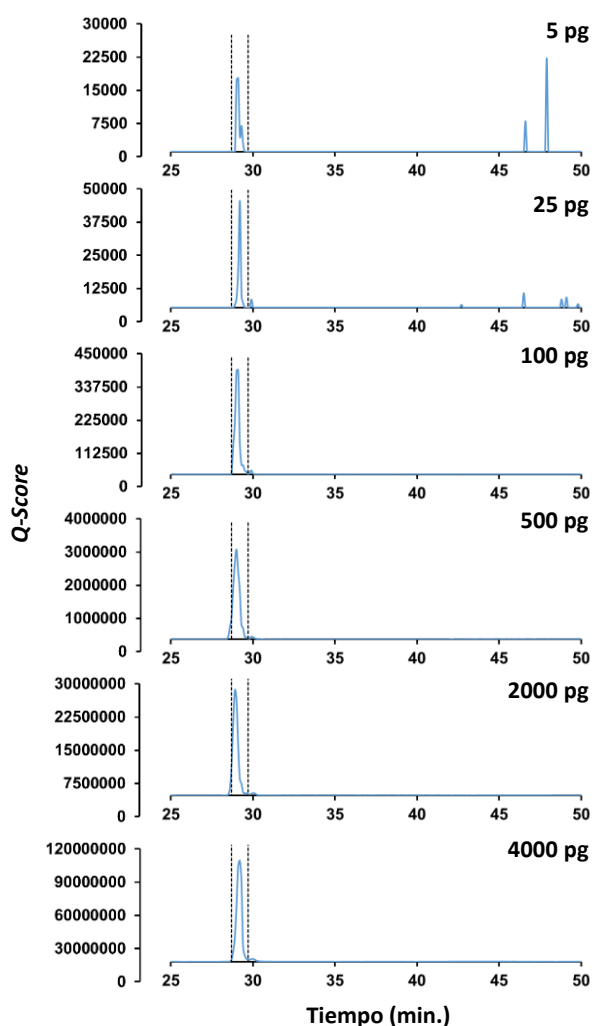


Figura 16. Trazas del *Q-Score* calculado para el péptido K.SATYVNTEGR.A⁺₂. De arriba abajo se muestra la traza cuantificada con *Q-Score* para el péptido AQUA (6 ¹³C y 4 ¹⁴N) de carga 2, de secuencia SATYVNTEGR, en cantidades crecientes 5 pg, 25 pg, 100 pg, 500 pg, 2000 pg y 4000 pg. La línea discontinua marca un minuto de tiempo de retención alrededor del pico de la muestra más concentrada.

La aplicación del método al resto de péptidos determinó que en los rangos indicados es perfectamente cuantitativo y lineal (Figura 17) para todos los péptidos analizados. En todos los casos el coeficiente de correlación de las rectas dio por encima de 0,97. Comparativamente con otros métodos que utilizan adquisición de datos independientes de intensidad como SWATH; somos capaces de cuantificar en los mismos rangos [277], en nuestro caso desde 10 fmoles (5 pg), y tenemos coeficientes de correlación similares.

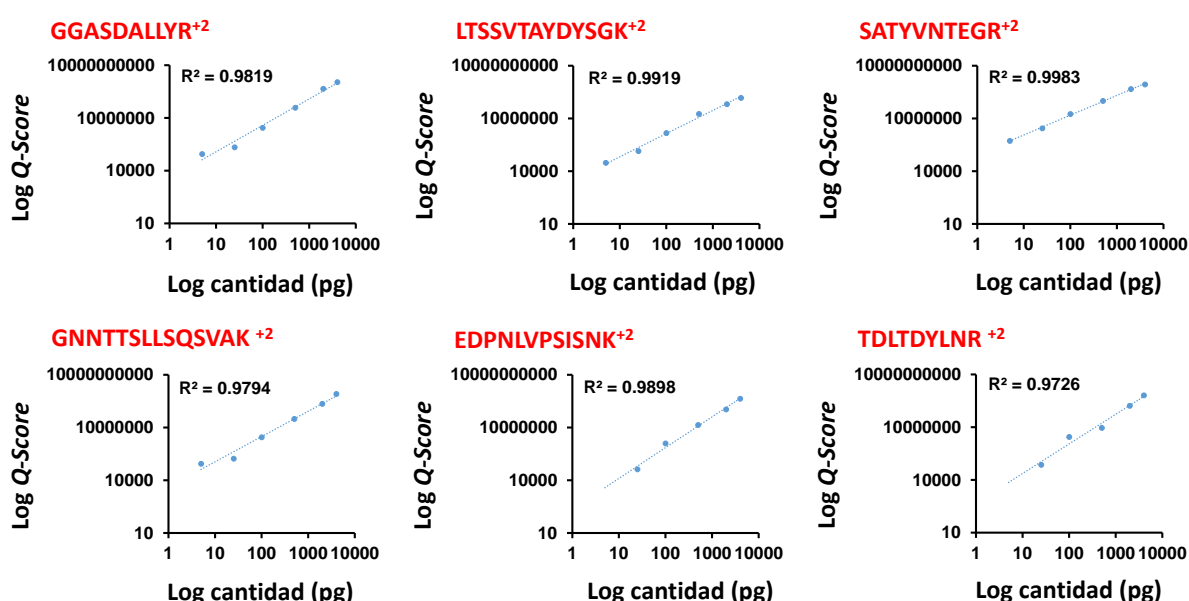


Figura 17. Cuantificación de los distintos péptidos con los que dopamos las muestras para determinar el rango lineal de cuantificación por Q-Score. Regresiones lineales de las cuantificaciones de los péptidos AQUA añadidos (R (6 ^{13}C y 4 ^{14}N) y K (6 ^{13}C y 2 ^{14}N)) a un extracto digerido más complejo utilizando el Q-Score según el método propuesto.

2.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO DIS AL ESTUDIO DEL INTERACTOMA DE RCAN1

La ausencia de RCAN1 confiere a los ratones una remarcable resistencia contra el desarrollo de procesos patológicos de remodelado vascular como aneurismas y restenosis inducidos por AngII [58], sin embargo, a nivel molecular, no se detallan qué otras rutas conectadas con RCAN1 pueden explicar los fenotipos observados. Por ese motivo, es muy importante conocer qué proteínas están interaccionando específicamente con RCAN1 y en qué otras rutas celulares están implicadas en las células de músculo liso vascular.

En primer lugar, para poner a punto tanto la inmunoprecipitación como el método de cuantificación y análisis, comparamos las muestras procedentes de la inmunoprecipitación de cerebro de ratones WT y KO (*Rcan1*^{-/-}), generados por Porta y colaboradores [183]; en los que se eliminó de forma constitutiva la expresión de ambas isoformas de *Rcan1*, RCAN1.1 y RCAN1.4 por medio de la interrupción del gen en el exón 6, que es común a ambas isoformas (Figura 1.2 de Materiales y Métodos). Empezamos con este tipo de muestra cuya expresión de RCAN1 es mucho mayor que en arteria y su

obtención es mucho más inmediata y sencilla que el cultivo de explantes de segmentos de aortas que es el objetivo final.

La naturaleza determinista de la adquisición independiente de intensidad hace que los resultados no se vean sesgados ni hacia las proteínas más abundantes ni hacia las de mayor tamaño, lo cual le confiere a esta técnica una alta reproducibilidad. Esta característica la convierte en idónea para la cuantificación de proteomas provenientes de muy poca cantidad de muestra y que deben abordarse por técnicas de *label-free*. Por todas estas razones, el DiS, en combinación con la inmunoprecipitación de proteínas, es idónea para el estudio exhaustivo del interactoma de proteínas relativamente poco abundantes como el caso de RCAN1, presente en cantidades del orden de 65.000 copias por célula (datos extraídos del experimento de evolución temporal). Además, la aplicación del modelo estadístico WSPP nos va a permitir determinar qué proteínas interaccionan específicamente con RCAN1.

2.4.1. Análisis cuantitativo del interactoma basal de RCAN1 en cerebro

Los péptidos obtenidos a partir de la digestión de las proteínas procedentes de la inmunoprecipitación [278] de lisado total de tejido cerebral con un anticuerpo específico frente a RCAN1 (Sigma-Aldrich) que reconoce al péptido PVINYDLLYAISKLGPG EKYELHAATDTTPSVVHVCESDQEKEEEEEEME, común a ambas isoformas (RCAN1.1 y RCAN1.4) y que se encuentra codificado por parte del exón 6 y parte del exón 7; fueron cuantificados a nivel de péptido individual como el cociente del máximo *Q-Score* de cada péptido individual (secuencia-carga) de la muestra WT entre el máximo *Q-Score* para los mismos en la muestra procedente de ratones KO (*Rcan1*^{-/-}).

Estos datos cuantitativos fueron analizados usando el modelo estadístico WSPP [63, 193]. La aplicación del modelo estadístico ideado *a priori* para el análisis de datos cuantitativos provenientes de muestras marcadas isotópicamente es universal y aplicable además a muestras no marcadas (*label-free*) como la que estamos analizando. La calibración inicial de los datos cuantitativos experimentales se hace tomando como peso estadístico, el valor máximo de *Q-Score* de la pareja de señales provenientes de las condiciones que se están comparando para cada péptido único (con una secuencia y carga en particular) y se calibra de acuerdo a la desviación cuadrática media entre la curva teórica que se ajusta a una función hiperbólica (Figura 18, A), como se describe en [63], de esta manera se calcula el parámetro k_e como 73,32. Las varianzas a nivel de scan (σ^2_s), péptido (σ^2_p) y proteína (σ^2_Q) (Figura 18, B) fueron similares a las obtenidas en otros proteomas [186, 279] además la distribución acumulativa de la variable estandarizada experimental a los diferentes niveles (Z_s , Z_p y Z_{qa}) (Figura 18, B, línea roja) se ajustan a las curvas teóricas (Figura 18, B, línea negra) lo que sugiere que el análisis de espectrometría de masas, la digestión de proteínas y la determinación de proteína que

cambian de abundancia de manera significativa en la muestra KO frente a la WT, fue llevada a cabo dentro de los estándares esperados y son fiables.

Observando la dispersión de las medidas de proteínas individuales (Figura 18, C), vemos que estamos ante un proteoma claramente asimétrico, encontrando un 84% de aumentos en WT contra KO, es decir, se unen específicamente al anticuerpo, aquellas proteínas cuyo ratio cuantitativo se desvía por encima de 4 unidades de desviación estándar a nivel de proteína, o lo que es lo mismo su $FDR_{qa} < 5\%$. Por la naturaleza del proteoma analizado era de esperar la mayoría de las proteínas sean interacciones específicas, es decir, aumentos en la muestra WT. Mientras que tan solo 8 proteínas se están uniendo directamente al anticuerpo de manera inespecífica en la muestra KO, ya que no hay presencia alguna de RCAN1. La proteína con mayor cambio fue la propia proteína RCAN1 (Figura 18, C).

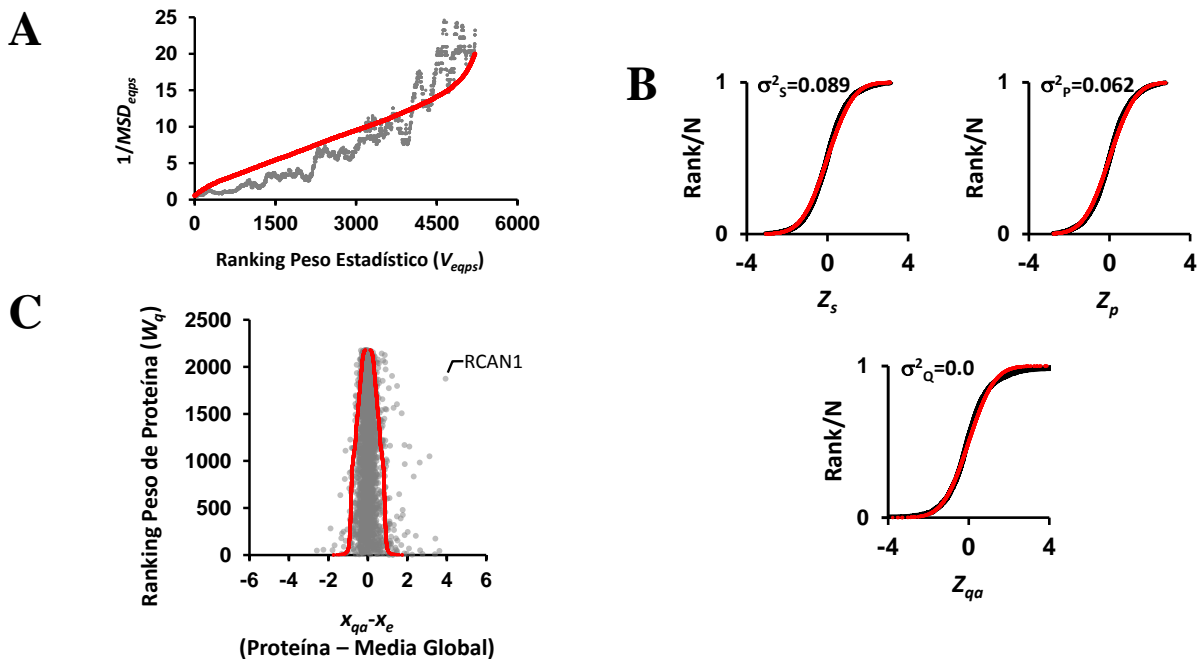


Figura 18. Aplicación del modelo WSPP a cuantificación *label-free* adquirida por método DiS. (A) Ajuste del ranking de pesos estadísticos de los espectros identificados a la inversa de la desviación cuadrática media, utilizada para calcular la constante de calibración ($k_e=73,32$). (B) Análisis de la normalidad de las cuantificaciones a nivel de espectro, péptido y proteína. Las tres curvas muestran la frecuencia de las distribuciones de la variable estandarizada a nivel de espectro (Z_s), péptido (Z_p) y proteína (Z_{qa}) (puntos negros); la línea roja muestra la correspondiente distribución normal. (C) Precisión de la cuantificación de proteína. Muestra la dispersión de las proteínas con respecto de la media global. El eje y representa el ranking de los pesos estadísticos cuya inversa se usa para calcular las varianzas locales.

Como ya hemos mencionado, el método DiS de adquisición de los datos de espectrometría de masas nos permite rastrear la señal de todos y cada uno de los péptidos identificados durante toda la carrera cromatográfica. De esta manera controlamos que efectivamente la proteína cebo o control positivo (RCAN1) se encuentra sobrerrepresentada en la inmunoprecipitación del WT, señal roja; frente al KO, señal verde

(Figura 19). También, controlamos la señal de varias proteínas que identificamos y cuya interacción se ha descrito previamente en la literatura (Figura 20) como las dos isoformas de la calcineurina A catalítica (PPP3CA y PPP3CB) [280], ambas expresadas en cerebro según BIOGPS (<http://biogps.org>), así como la subunidad reguladora PPP3R1, aunque en este caso no está claro si se une de manera directa o indirecta, y GSK3 β [281]. Además, se caracterizaron otros 40 posibles interactores en condiciones basales y en cerebro entre las que destacamos UPF0364 y GLRX por su aparición en tres réplicas distintas, así como ACTN2 y VDAC2, por su importancia en cerebro. El listado completo de los posibles interactores se presenta en el material suplementario (Tabla Suplementaria 4).

Como hemos comentado, RCAN1 se expresa abundantemente en cerebro, pero además se sabe que se sobreexpresa en cerebros de pacientes de síndrome de Down y de Alzheimer [282]. RCAN1 juega un papel importante durante el desarrollo y funcionamiento normal del cerebro y la regulación positiva de su expresión contribuye a las deficiencias neuronales asociadas a síndrome de Down que afectan al aprendizaje y a la memoria [283]. Muy probablemente, gran parte de las funciones atribuidas a RCAN1 se hagan a través de uno de los interactores que hemos detectado, GSK3 β . Por una parte, RCAN1 estimula la expresión de GSK3 β [284], pero además está descrita su interacción proteína - proteína, ya que GSK3 β es regulada por la propia RCAN1 a nivel post-transcripcional [284]. La desregulación de GSK3 β incrementa la pérdida de neuronas del hipocampo disparando su apoptosis lo que compromete la memoria en Alzheimer [285]. Esta neurodegeneración es probablemente precipitada por RCAN1, a través de una prolongada inhibición de calcineurina, en nuestro experimento detectamos como posibles interactores el heterodímero completo CNA, la subunidad catalítica (PPP3CA) y la subunidad reguladora CNB (PPP3R1); junto con una posible inducción de la activación de GSK3 β , a las que estamos detectando juntas, producirían una hiperfosforilación de TAU que promueve múltiples efectos en la mitocondria [286]. La propia GSK3 β , dispararía la transición a la permeabilización mitocondrial, un paso clave en la apoptosis por vía intrínseca [287], mediando la interacción con el canal de aniones dependiente de voltaje 2 (VDAC2) [288], que detectamos también como interactor específico de RCAN1. Esta proteína, que es la isoforma predominante en las mitocondrias de cerebro no sólo es crucial para la supervivencia celular sino que también se ha implicado en Alzheimer [289]. Por otra parte, otro de los interactores potenciales que detectamos GLRX, es esencial para el desarrollo cerebral [290] y para el mantenimiento del complejo I mitocondrial [291]. Además, encontramos como interactores una proteína del complejo III, UQCRB; otra del complejo IV, CYCT; y otras dos proteínas del complejo V mitocondrial, ATP5F y ATP5A1, plausiblemente relacionadas con la disminución del ratio ATP/ADP que provoca RCAN1 vía GSK3 β [286] junto con otra posible proteína interactora: ARL1. Esta última proteína, cuya función en mitocondria no está descrita y otra miembro de su familia ARL2, con la que

comparte el 45% de su secuencia [292], interactúan con el transportador de nucleótidos adenina (ANT), un componente integral de la membrana mitocondrial interna, que se usa para intercambiar ATP y ADP, otra de las funciones mitocondriales afectadas vía GSK3 β [286].

Otro gran bloque de posibles interactores lo componen múltiples proteínas de citoesqueleto, microfilamentos de actina como ACTA2, proteínas reguladoras o de unión a actina como ACTN2 y ACTN4, múltiples tropomiosinas como TPM1 y TPM2 y la troponina 1 (TNNC1). Además encontramos algunos filamentos intermedios como desmina y vimentina, así como multitud de isoformas diferentes de miosinas entre las que encontramos MYH8, MYH7, MYH7B, MYH13 y MYL2. Aunque todas ellas se expresaban en cerebro según *Gene Expression Atlas* (<https://www.ebi.ac.uk/gxa>), se conoce muy poco acerca de su participación en el desarrollo cerebral y más concretamente su relación con RCAN1. Su implicación estaría más relacionada con la organización estructural de las neuronas y su morfología, aunque el papel de muchas de ellas está por elucidar. Se conoce que por ejemplo: α -Actinina-2 (ACTA2), media en la morfología y ensamblaje de las neuronas de hipocampo [293], muy relacionadas con la memoria, a través de la organización del citoesqueleto de actina. Por su parte, se conoce que MYH8 está implicada en el crecimiento celular y diferenciación neuronal [294].

Finalmente encontramos ARGL1 como posible interactor de RCAN1. Esta proteína se relaciona con otro tipo de enfermedades que producen demencia o pérdida progresiva de memoria la enfermedad de Lafora, caracterizada por la aparición de los cuerpos de Lafora, cúmulos de poliglucosanos y cuya degradación está mediada por ARGL1, la enzima desramificadora del glucógeno 1.

Con todo resulta de gran interés, conocer el interactoma basal de RCAN1 en cerebro como punto de partida para la identificación de posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con una inadecuada formación de la memoria. Sin un análisis masivo no dirigido como el que se ha realizado, sería imposible caracterizar en un solo experimento las proteínas relacionadas con la señalización y estructurales implicadas en dichas enfermedades y que tienen como nodo común a RCAN1.

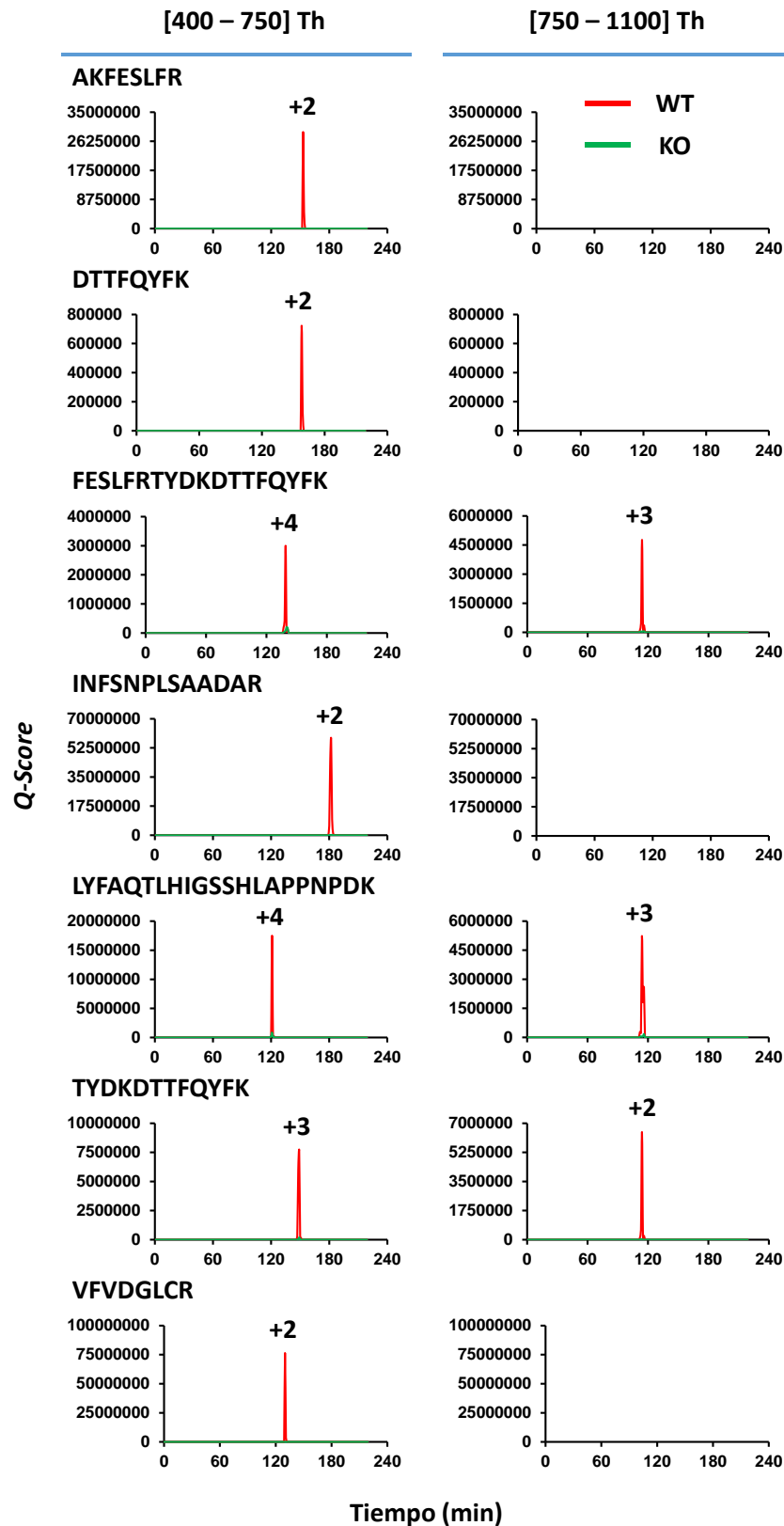


Figura 19. Distribución de los Q-Score empleados para la cuantificación *label-free* de los péptidos de la proteína cebo RCAN1. En los paneles de la izquierda se muestra la distribución de los Q-Score en el tiempo de la carrera cromatográfica adquiriendo las masas/cargas del primer rango DiS, entre 400 y 750 Th; y en los paneles de la derecha se muestra la distribución de los Q-Score en el segundo rango de masas/cargas, entre 750 y 1100 Th. En rojo se representa la señal debida a los péptidos de la muestra WT, mientras que en verde se representa la distribución de la muestra KO.

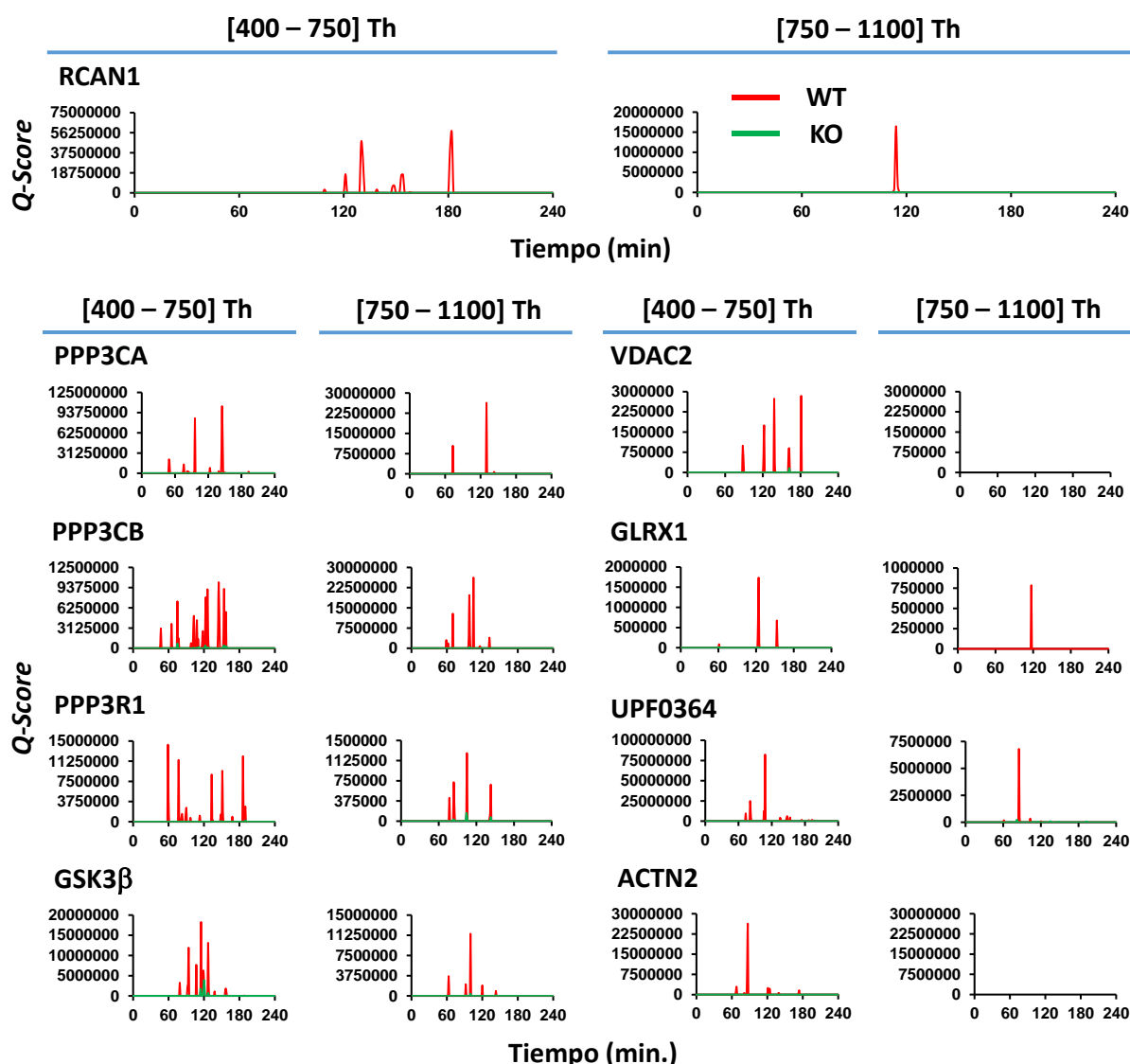


Figura 20. Distribución de los Q-Score empleados para la cuantificación *label-free* de las proteínas más significativas del análisis del interactoma RCAN1 en cerebro en condiciones basales. En los paneles de la izquierda se muestra la distribución de los Q-Score en el tiempo de la carrera cromatográfica adquiriendo las masas/cargas del primer rango DiS, entre 400 y 750 Th; y en los paneles de la derecha se muestra la distribución de los Q-Score en el segundo rango de masas/cargas, entre 750 y 1100 Th. En rojo se representa la señal debida a los péptidos de la muestra WT, mientras que en verde se representa la distribución de la muestra KO.

2.4.2. Caracterización del interactoma basal y activado de RCAN1 en explantes de aorta

Nuestro siguiente objetivo fue determinar las diferencias en la red de interacción de RCAN1 en condiciones activadas con AngII que expliquen los fenotipos observados por el grupo de Juan Miguel Redondo [295] en los que la ausencia de expresión de *Rcan1*, en modelos animales *Rcan1*^{-/-}, les confería una remarcable resistencia contra el desarrollo de procesos patológicos de remodelado vascular como aneurismas y restenosis inducidos por la propia AngII. Para ello analizamos, utilizando la aproximación optimizada con las

muestras de cerebro; el interactoma basal y activado durante 1,5 h con AngII de RCAN1 en extractos de proteínas obtenidos a partir de explantes de aortas de ratones *Rcan1*^{+/+} y *Rcan1*^{-/-}. En estos extractos están presentes varios tipos celulares, células endoteliales, fibroblastos y células de músculo liso que son las células mayoritarias de los grandes vasos como la aorta. Recurrimos a esta fuente de células VSMC por la inmediatez en su obtención y la facilidad para la activación.

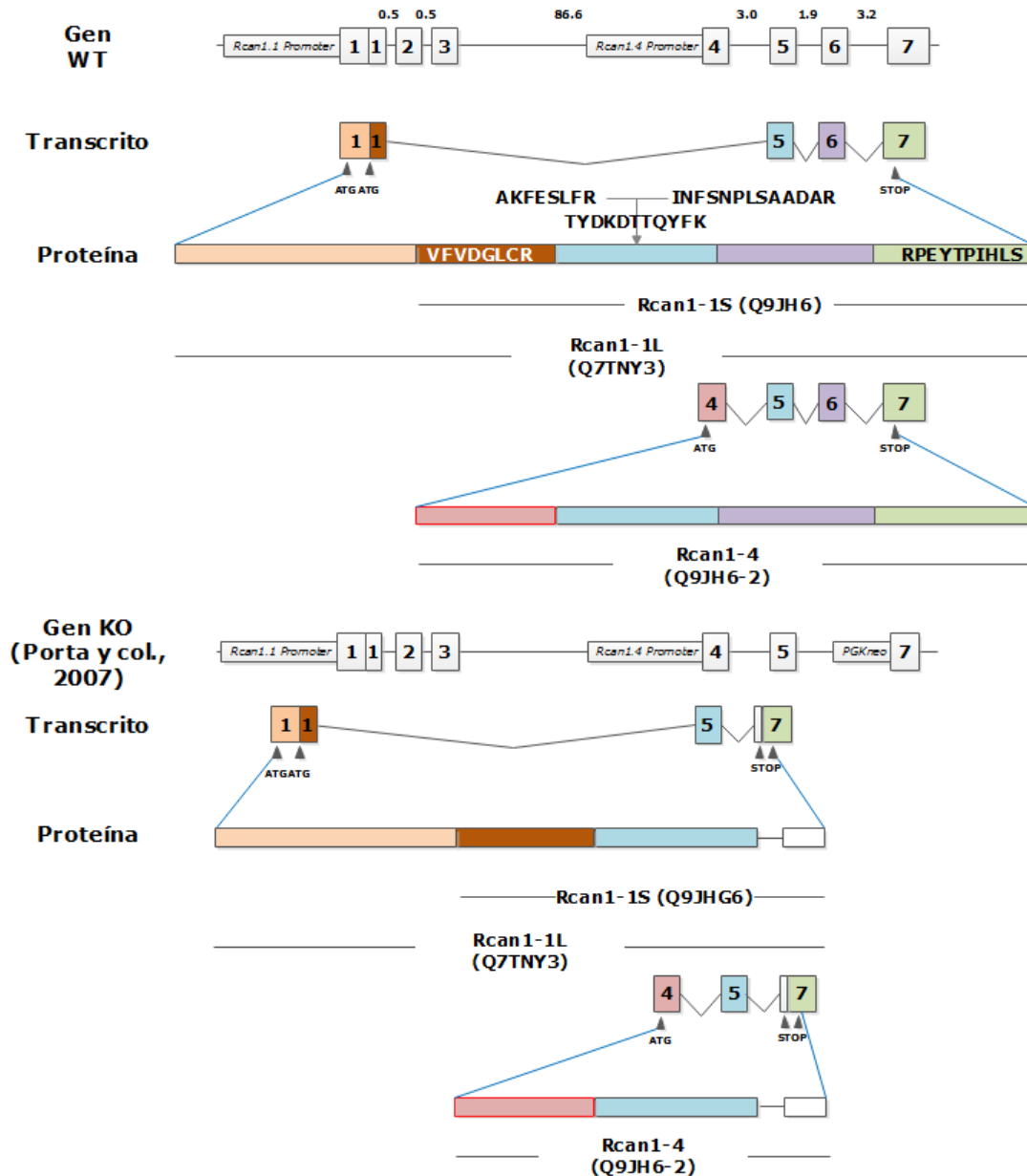


Figura 21. Estructura génica de los ratones WT y transgénicos *Rcan1*^{-/-}. En la parte superior, se muestra la estructura génica del gen *Rcan1*, su transcripción y su traducción a las isoformas 1.1 y 1.4. En la parte inferior, se muestra el resultado de la recombinación producida en el gen *Rcan1*, publicada por Porta y colaboradores en 2007 [102]. Posteriormente su transcrito y las proteínas resultantes. (En la proteína WT, se indica la posición y secuencia de los péptidos identificados en el experimento).

La proteína RCAN1 tiene 2 isoformas principales. La isoforma 1.1 que puede generar dos tipos de proteínas, la forma corta (S) y la forma larga (L), que son de expresión

constitutiva [296]. Como se puede ver en la parte superior de la Figura 21, en ambos casos, se genera por la expresión de los exones 1, 5, 6 y 7. Y la isoforma 1.4 que es inducible [296] y se genera a partir de la expresión de los exones 4, 5, 6 y 7.

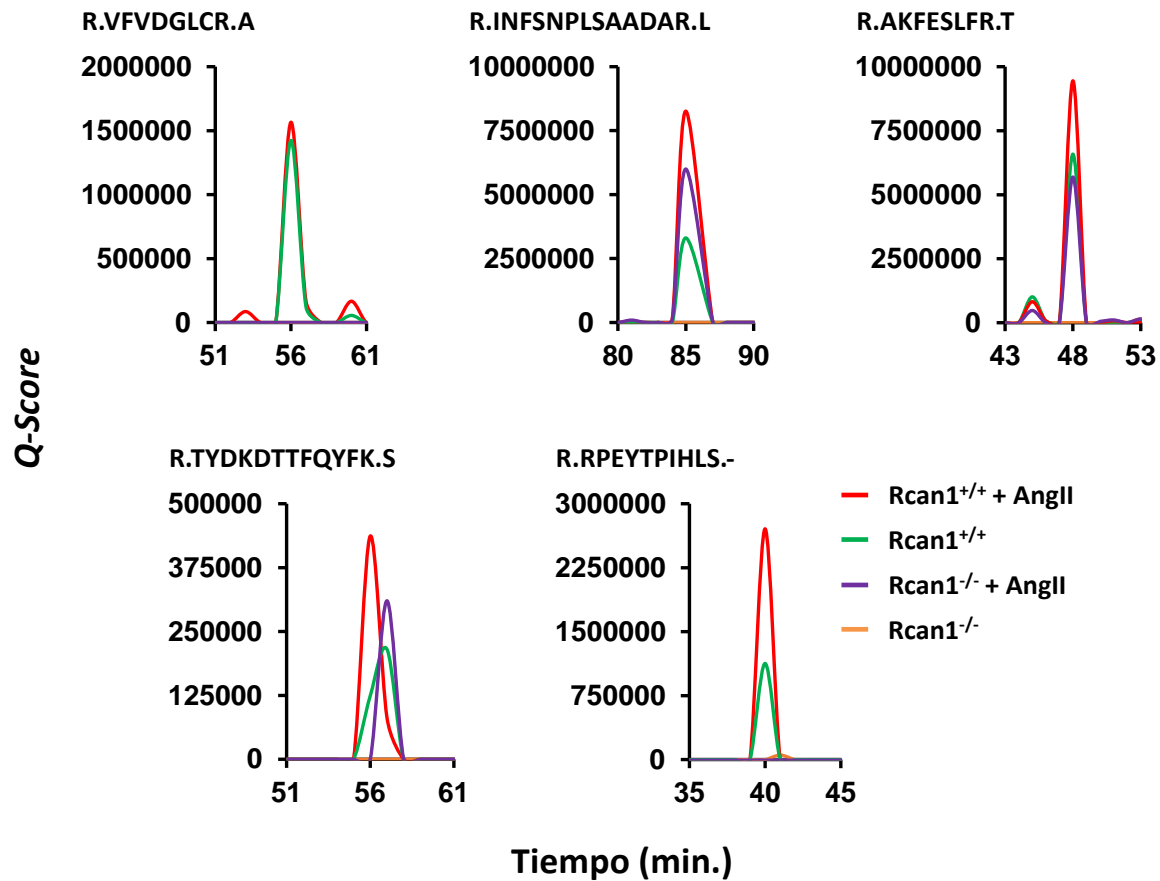


Figura 22. Cuantificación *label-free* mediante *Q-Score* de RCAN1 en extractos obtenidos a partir de aortas de ratón. Comparativa de los péptidos indicados en la parte superior entre la muestra control (verde) y tratada con AngII durante 1,5 h (rojo) en ratones WT, y en las muestras Rcan1^{-/-} en condiciones basales (naranja) y activadas con AngII durante 1,5 h (morado).

En un análisis preliminar utilizando la metodología DiS, identificamos cinco péptidos de RCAN1 con los que cuantificamos dicha proteína. Uno codificado por el exón 1, de secuencia VFVDGLCR, exclusivo de la isoforma 1.1, tres del exón 5, comunes a ambas isoformas, AKFESLFR, TYDKDTTFQYFK y INFSNPLSAADAR, y finalmente justo el péptido del extremo C-terminal, RPEYTPIHLS, como se mapean en la proteína silvestre de la Figura 21. En el caso de los animales WT, vimos que de manera generalizada aumentaba la expresión de RCAN1, cuando observamos péptido a péptido que estaba pasando, observamos que el péptido del exón 1, no varía, señal roja y verde de la primera gráfica de la Figura 22, mientras que el resto de los péptidos pertenecientes a los exones 5 y 7, prácticamente doblan su señal cuando se activan las células con AngII. Estos exones son comunes a la isoforma 1.4 que es inducible [296]. Por tanto, el aumento que vemos posiblemente se deba a la inducción de esta isoforma. En el caso de los ratones Rcan1^{-/-},

en condiciones basales no vemos ningún péptido, señal naranja en la Figura 22. Mientras que sí vemos los tres péptidos del exón 5 y no vemos el péptido del C-terminal, último gráfico de la Figura 22, señal morada. Es decir, en el caso de la activación, posiblemente estamos viendo la expresión de una forma truncada de la isoforma 1.4, a la luz de los péptidos observados, ya que si nos fijamos en la parte inferior de la Figura 21, esperaríamos encontrar tan solo estos tres péptidos del exón 5, exón azul en la Figura.

Estos resultados, no son incompatibles con lo publicado por Porta y colaboradores en 2007 [183]. Puesto que no tenemos evidencia de la expresión de la proteína en condiciones basales de RCAN1 en los animales KO, y cuando se induce la expresión no tenemos evidencia de la expresión de la parte eliminada en el transgen (exón 6 y parte del 7) (Figura 21). Además, la presencia de la proteína truncada no tiene por qué tener ningún significado funcional. Sin embargo, para un estudio a nivel estructural y teniendo en cuenta que la proteína se expresa y se modula con el estímulo de AngII, ante la ausencia de un control negativo óptimo que nos permitiría determinar las diferencias entre el interactoma basal y activado de RCAN1 en ratones WT, podemos comparar el interactoma basal y activado de los ratones KO, para determinar el interactoma activado de la isoforma 1.4, al menos de la parte expresada en estos ratones, lo cual nos ayudaría a responder qué está haciendo a nivel molecular que la ausencia de esta proteína proteja de los procesos patológicos de remodelado vascular.

La solución óptima podría consistir flanquear el exón 4 y el exón 6 por secuencias LoxP, en sendos animales, y cruzarlos con un animal que expresa la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno, de manera que en un momento determinado se produzca la escisión del exón de manera controlada y poder seleccionar qué exón eliminar el 4 para eliminar la isoforma 1.4 o el 6 para eliminar la 1.1, generando así dos controles negativos que nos permitiesen ver la diferencia en los interactomas de 1.1 y 1.4.

2.4.2.1. Caracterización del interactoma de RCAN1.4

Finalmente, comparamos aplicando nuestro modelo estadístico y utilizando el *Q-Score* del máximo para cada péptido (masa-carga), la señal procedente del inmunoprecipitado de RCAN1 de los ratones *Rcan1*^{-/-} control y tratados con AngII durante 1,5 h. Al igual que en el interactoma basal de RCAN1, observamos un número mayor de proteínas potenciales interactores $FDR_{qa} < 5\%$ y Z_{qa} negativo (en este caso calculamos el \log_2 ratio Control / AngII) que de inmunoprecipitaciones inespecíficas ($FDR_{qa} < 5\%$ y Z_{qa} positiva) como se puede observar en la Tabla Suplementaria 5.

Lo más interesante de este resultado es que la mayoría de las interacciones potenciales que obtenemos ninguna esté descrita en la literatura (Figura 23), si bien, sí están descritas relaciones de algunos de los posibles interactores entre sí, como la unión múltiples proteínas de matriz extracelular como THBS1, SERPINE1 (PAI-1), los

fibrinógenos y algunas proteínas del complemento (C3 y C4B), por lo que podríamos considerar como una evidencia indirecta de que los resultados son fiables. Son precisamente estas proteínas las que interconectan los dos grandes bloques de esta tesis.

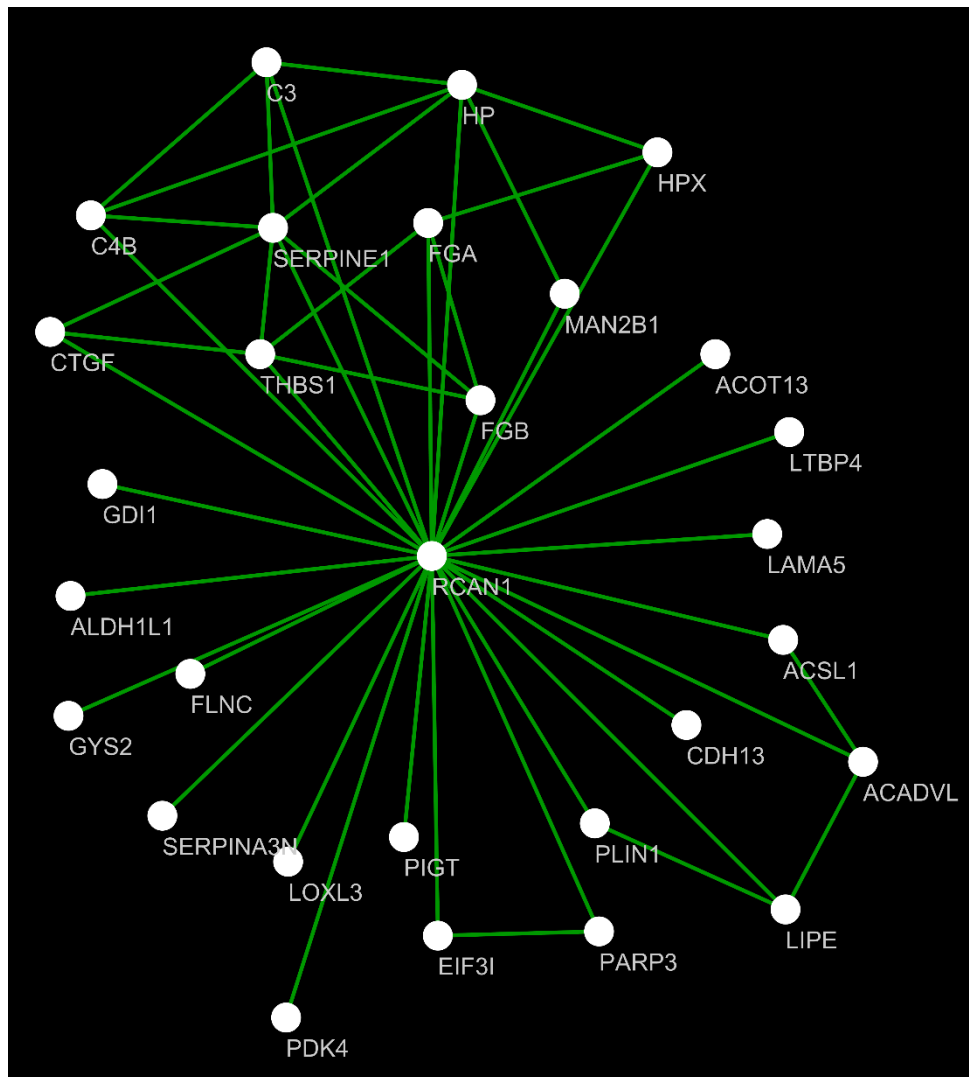


Figura 23. Interactoma de RCAN1.4. En la parte central se encuentra RCAN1 (Isoforma 1.4) que se encuentra conectada con todas los posibles interactores del experimento ($FDR_{qa} < 5\%$). El resto de hilos que interconectan algunas otras proteínas entre sí, fueron extraídas de STRING (28/05/2016).

Por un lado vemos como posibles interactores a la proteína EIF3L y PARP3 que STRING encuentra relacionadas por co-aparición en diferentes *abstract* en la literatura. El primero es un factor de iniciación de la traducción lo cual estaría enlazando con los resultados anteriores en VSMC. En ellos veíamos que el tratamiento con AngII, inducía la hipertrofia de las células, lo cual nosotros veíamos reflejado en un aumento generalizado de la maquinaria de síntesis de proteínas [165]. La relación con este factor de iniciación de la traducción a través de RCAN1.4 hace que se conecten ambos fenómenos. PARP3 por su parte también estaría relacionada con el fenotipo observado en VSMC adquirido por tratamiento con AngII, en la manera en que PARP3 participa en la reparación del DNA

[297]. Puesto que es uno de los puntos de control más importante que tienen lugar durante la proliferación celular [298]. Otro importante fenómeno fenotípico en el que estaría interviniendo AngII en VSMC [165].

Otro gran bloque de proteínas interactoras de RCAN1.4 y que tienen relación con los resultados anteriores son CTGF, HP, HPX, MAN2B1, THBS1, PAI-1, MAN2B1, FGB y FGA, que junto con C3 y C4B son todas ellas proteínas cuya mayor parte de su vida media se encuentra en la matriz extracelular. La relación de las dos últimas con el fenotipo observado (C3 y C4B) en VSMC bajo tratamiento con AngII, lo relacionamos con la represión del fenotipo proliferativo – secretor [165] y aquí lo vemos conectado con RCAN1.4.

El resto son un grupo bastante heterogéneo de proteínas, todas ellas son proteínas de respuesta a estrés (según Gene Ontology 28/05/2016), y muchas de las mismas CTGF, MAN2B1, THBS1, FGB, FGA y PAI-1, están relacionadas con la regulación positiva de la ruta de las MAPK. Una categoría que en el análisis del proteoma completo de VSMC aparecía aumentada (Tabla 3) y que algunas detectamos y se muestran en la Tabla Suplementaria 1. Con lo que de nuevo nos conecta ambos resultados.

Y finalmente encontramos otro pequeño grupo de proteínas, que son bastante interesantes y que junto con el resto de interactores podrían explicar la resistencia al desarrollo de los procesos patológicos relacionados con el remodelado vascular. PLIN, LIPE, ACDVL y ACSL1. Las cuatro íntimamente ligadas con la movilización de grasas. La primera, PLIN o perilipina, es un importante regulador del almacenamiento de lípidos y puede jugar un papel clave en hipertensión combinada con obesidad [299]. LIPE la enzima lipasa es activada a su vez por la anterior al fosforilarse [300]. ACADVL y ACSL1 son la enzima dehidrogenasa y ligasa de ácidos grasos de cadena muy larga y larga, respectivamente, catalizando la entrada en la beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga y muy larga [300]. Aunque con los datos que tenemos no podemos determinar en qué manera RCAN1.4 regula este importante proceso en las arterias bajo el estímulo hipertrófico con AngII, sí que podemos aseverar que es un importante punto de partida para futuros estudios, puesto que uno de los mayores factores de riesgo cardiovascular junto con la hipertensión serían aquellos relacionados con la hipercolesterolemia y otros trastornos relacionados con el metabolismo de grasas.

CONCLUSIONES

1. El modelo estadístico del Triángulo de Biología de Sistemas (SBT) ha permitido revelar con un alto nivel de detalle la respuesta coordinada de las proteínas durante la estimulación de células de músculo liso vascular con angiotensina II. Dichos cambios coordinados van surgiendo de forma gradual, se mantienen en el tiempo, y se adscriben fundamentalmente a complejos de proteínas y rutas metabólicas, indicando que las interacciones proteína-proteína juegan un papel central en la co-regulación de los niveles de proteínas.
2. La angiotensina II produce una serie de cambios coordinados que tienden a aumentar hasta las 8 horas de tratamiento, haciendo que las células de músculo liso vascular adquieran un fenotipo hipertrófico y contráctil. Además, induce alteraciones coordinadas de proteínas, que son reflejo de la migración, la represión de la proliferación celular y la secreción de proteínas. La gran mayoría de las proteínas implicadas en la acción coordinada de la angiotensina II no han sido descritas previamente lo cual podría redefinir el papel de las células de músculo liso vascular y la angiotensina II en las etapas iniciales del remodelado vascular.
3. Existen una serie de proteínas reguladoras o con papeles funcionalmente diferenciales dentro de las categorías biológicas alterados por angiotensina II en nuestro modelo celular como las profilinas 1 y 2, la miosina 10 y ciertos tipos de colágenos, que podrían jugar papeles importantes en el proceso de migración de las células de músculo liso en las etapas iniciales de la inducción con angiotensina II.
4. La nueva tecnología de adquisición independiente de datos (DiS) que hemos desarrollado aún muchas de las ventajas de las aproximaciones de proteómica masiva y proteómica dirigida. DiS mejora los rendimientos en cuanto a número de identificaciones de la aproximación masiva y tiene una sensibilidad similar a la tecnología SWATH, pero no requiere de librerías de espectros. Los valores cuantitativos obtenidos con DiS son compatibles con el modelo estadístico WSPF previamente desarrollado en el laboratorio.
5. La isoforma de RCAN1 inducible por angiotensina II, RCAN1.4, parece interaccionar con una red de proteínas funcionalmente implicadas en la respuesta temprana de las células de músculo liso vascular a angiotensina II y que incluye, entre otras, a la trombospodina 1, el inhibidor del activador del plasminógeno-1 y los fibrinógenos A y B. Estas interacciones podrían explicar la resistencia de los ratones *Rcan1^{-/-}* a generar enfermedades cardiovasculares relacionadas con el remodelado vascular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mathers CD, Loncar D: **Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030**. *PLoS Med* 2006, **3**(11):e442.
2. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG: **The Developing Human: Clinically Oriented Embryology**: Elsevier Health Sciences; 2015.
3. Libby P, Ridker PM, Hansson GK: **Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis**. *Nature* 2011, **473**(7347):317-325.
4. Louis SF, Zahradka P: **Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion**. *Exp Clin Cardiol* 2010, **15**(4):e75-85.
5. Mescher AL, Junqueira LC: **Junqueira's basic histology : text & atlas**. New York [etc.]: McGraw-Hill Medical; 2010.
6. Pasterkamp G, de Kleijn DP, Borst C: **Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications**. *Cardiovasc Res* 2000, **45**(4):843-852.
7. Pasterkamp G, Galis ZS, de Kleijn DP: **Expansive arterial remodeling: location, location, location**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, **24**(4):650-657.
8. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C: **Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications**. *Circulation* 2000, **102**(10):1186-1191.
9. Heeneman S, Sluimer JC, Daemen MJ: **Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling**. *Circ Res* 2007, **101**(5):441-454.
10. Schaper W, Ito WD: **Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth**. *Circ Res* 1996, **79**(5):911-919.
11. Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, Koltai S, Mousavipour D, Scholz D, Afsah-Hedjri A, Schaper W, Schaper J: **Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries**. *J Mol Cell Cardiol* 1998, **30**(11):2291-2305.
12. Louis SF, Zahradka P: **Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion**. *Exp Clin Cardiol* 2010, **15**(4):e75-85.
13. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR: **Cell migration: integrating signals from front to back**. *Science* 2003, **302**(5651):1704-1709.
14. Touyz RM: **Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II**. *Exp Physiol* 2005, **90**(4):449-455.
15. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA: **Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice**. *J Clin Invest* 2000, **105**(11):1605-1612.
16. Heeneman S, Sluimer JC, Daemen MJ: **Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling**. *Circ Res* 2007, **101**(5):441-454.
17. Weintraub NL: **Understanding abdominal aortic aneurysm**. *N Engl J Med* 2009, **361**(11):1114-1116.
18. Hall JE, Guyton AC: **Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology**: Elsevier; 2015.
19. Danilczyk U, Penninger JM: **Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney**. *Circ Res* 2006, **98**(4):463-471.

20. Hall JE, Brands MW, Henegar JR: **Angiotensin II and long-term arterial pressure regulation: the overriding dominance of the kidney.** *J Am Soc Nephrol* 1999, **10 Suppl 12**:S258-265.
21. Greene EL, Lu G, Zhang D, Egan BM: **Signaling events mediating the additive effects of oleic acid and angiotensin II on vascular smooth muscle cell migration.** *Hypertension* 2001, **37**(2):308-312.
22. Hunyady L, Catt KJ: **Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II.** *Mol Endocrinol* 2006, **20**(5):953-970.
23. Porrello ER, Delbridge LM, Thomas WG: **The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor.** *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009, **14**:958-972.
24. Berk BC: **Angiotensin type 2 receptor (AT2R): a challenging twin.** *Sci STKE* 2003, **2003**(181):PE16.
25. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G: **Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging.** *EMBO Mol Med* 2010, **2**(7):247-257.
26. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA: **Localization and function of angiotensin AT1 receptors.** *Am J Hypertens* 2000, **13**(1 Pt 2):31S-38S.
27. Nahmias C, Strosberg AD: **The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function.** *Trends Pharmacol Sci* 1995, **16**(7):223-225.
28. Matsubara H: **Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases.** *Circ Res* 1998, **83**(12):1182-1191.
29. Schulman IH, Raij L: **The angiotensin II type 2 receptor: what is its clinical significance?** *Curr Hypertens Rep* 2008, **10**(3):188-193.
30. Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM: **Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(8):3521-3525.
31. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK: **Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells.** *Circ Res* 1988, **62**(4):749-756.
32. Ji Y, Liu J, Wang Z, Liu N: **Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells.** *Cell Physiol Biochem* 2009, **23**(4-6):265-276.
33. Boucard AA, Roy M, Beaulieu ME, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, Leduc R: **Constitutive activation of the angiotensin II type 1 receptor alters the spatial proximity of transmembrane 7 to the ligand-binding pocket.** *J Biol Chem* 2003, **278**(38):36628-36636.
34. Feng YH, Sun Y, Douglas JG: **Gbeta gamma -independent constitutive association of Galpha s with SHP-1 and angiotensin II receptor AT2 is essential in AT2-mediated ITIM-independent activation of SHP-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(19):12049-12054.
35. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ: **Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis.** *J Biol Chem* 1997, **272**(30):19022-19026.

36. Gendron L, Oligny JF, Payet MD, Gallo-Payet N: **Cyclic AMP-independent involvement of Rap1/B-Raf in the angiotensin II AT2 receptor signaling pathway in NG108-15 cells.** *J Biol Chem* 2003, **278**(6):3606-3614.
37. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA *et al*: **The sequence of the human genome.** *Science* 2001, **291**(5507):1304-1351.
38. Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA, Jr., Rittenhouse SE: **Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle.** *Hypertension* 1985, **7**(3 Pt 1):447-451.
39. Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL: **Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase.** *Hypertension* 2000, **36**(5):851-855.
40. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE: **The role of tyrosine phosphorylation in angiotensin II-mediated intracellular signalling.** *Cardiovasc Res* 1995, **30**(4):530-536.
41. Yamakawa T, Tanaka S, Numaguchi K, Yamakawa Y, Motley ED, Ichihara S, Inagami T: **Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells.** *Hypertension* 2000, **35**(1 Pt 2):313-318.
42. Taniyama Y, Griendling KK: **Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms.** *Hypertension* 2003, **42**(6):1075-1081.
43. Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR: **Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature.** *Cell* 2001, **105**(7):863-875.
44. Molkenstein JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN: **A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy.** *Cell* 1998, **93**(2):215-228.
45. Heit JJ, Apelqvist AA, Gu X, Winslow MM, Neilson JR, Crabtree GR, Kim SK: **Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function.** *Nature* 2006, **443**(7109):345-349.
46. Aramburu J, Rao A, Klee CB: **Calcineurin: from structure to function.** *Curr Top Cell Regul* 2000, **36**:237-295.
47. Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A: **Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity.** *Mol Cell* 2000, **6**(3):539-550.
48. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A: **Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT.** *Genes Dev* 2003, **17**(18):2205-2232.
49. Alfranca A, Iniguez MA, Fresno M, Redondo JM: **Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases.** *Cardiovasc Res* 2006, **70**(3):446-456.
50. Minami T: **Calcineurin-NFAT activation and DSCR-1 auto-inhibitory loop: how is homeostasis regulated?** *J Biochem* 2014, **155**(4):217-226.
51. Goldacre MJ, Wotton CJ, Seagroatt V, Yeates D: **Cancers and immune related diseases associated with Down's syndrome: a record linkage study.** *Arch Dis Child* 2004, **89**(11):1014-1017.

52. Ryeom S, Baek KH, Rioth MJ, Lynch RC, Zaslavsky A, Birsner A, Yoon SS, McKeon F: **Targeted deletion of the calcineurin inhibitor DSCR1 suppresses tumor growth.** *Cancer Cell* 2008, **13**(5):420-431.
53. Baek KH, Zaslavsky A, Lynch RC, Britt C, Okada Y, Siarey RJ, Lensch MW, Park IH, Yoon SS, Minami T *et al*: **Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1.** *Nature* 2009, **459**(7250):1126-1130.
54. Suehiro J, Hamakubo T, Kodama T, Aird WC, Minami T: **Vascular endothelial growth factor activation of endothelial cells is mediated by early growth response-3.** *Blood* 2010, **115**(12):2520-2532.
55. Yang YJ, Chen W, Edgar A, Li B, Molkentin JD, Berman JN, Lin TJ: **Rcan1 negatively regulates Fc epsilonRI-mediated signaling and mast cell function.** *J Exp Med* 2009, **206**(1):195-207.
56. Hoeffler CA, Dey A, Sachan N, Wong H, Patterson RJ, Shelton JM, Richardson JA, Klann E, Rothermel BA: **The Down syndrome critical region protein RCAN1 regulates long-term potentiation and memory via inhibition of phosphatase signaling.** *J Neurosci* 2007, **27**(48):13161-13172.
57. Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, Antos CL, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN *et al*: **Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(6):3328-3333.
58. Mendez-Barbero N, Esteban V, Villahoz S, Escolano A, Urso K, Alfranca A, Rodriguez C, Sanchez SA, Osawa T, Andres V *et al*: **A major role for RCAN1 in atherosclerosis progression.** *EMBO Mol Med* 2013, **5**(12):1901-1917.
59. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A: **Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications.** *Annu Rev Biomed Eng* 2009, **11**:49-79.
60. Domon B, Aebersold R: **Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy.** *Nat Biotechnol* 2010, **28**(7):710-721.
61. Nesvizhskii AI, Vitek O, Aebersold R: **Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry.** *Nat Methods* 2007, **4**(10):787-797.
62. Mallick P, Kuster B: **Proteomics: a pragmatic perspective.** *Nat Biotechnol* 2010, **28**(7):695-709.
63. Navarro P, Trevisan-Herraz M, Bonzon-Kulichenko E, Nunez E, Martinez-Acedo P, Perez-Hernandez D, Jorge I, Mesa R, Calvo E, Carrascal M *et al*: **General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling.** *Journal of proteome research* 2014, **13**(3):1234-1247.
64. Gallien S, Domon B: **Quantitative proteomics using the high resolution accurate mass capabilities of the quadrupole-orbitrap mass spectrometer.** *Bioanalysis* 2014, **6**(16):2159-2170.
65. Cox J, Mann M: **Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology.** *Annu Rev Biochem* 2011, **80**:273-299.
66. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M: **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2002, **1**(5):376-386.

67. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, van Sluyter SC, Haynes PA: **Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry**. *Proteomics* 2011, **11**(4):535-553.
68. Mueller LN, Rinner O, Schmidt A, Letarte S, Bodenmiller B, Brusniak MY, Vitek O, Aebersold R, Muller M: **SuperHirn - a novel tool for high resolution LC-MS-based peptide/protein profiling**. *Proteomics* 2007, **7**(19):3470-3480.
69. Jaffe JD, Keshishian H, Chang B, Addona TA, Gillette MA, Carr SA: **Accurate inclusion mass screening: a bridge from unbiased discovery to targeted assay development for biomarker verification**. *Mol Cell Proteomics* 2008, **7**(10):1952-1962.
70. Schmidt A, Claassen M, Aebersold R: **Directed mass spectrometry: towards hypothesis-driven proteomics**. *Curr Opin Chem Biol* 2009, **13**(5-6):510-517.
71. Gallien S, Duriez E, Domon B: **Selected reaction monitoring applied to proteomics**. *J Mass Spectrom* 2011, **46**(3):298-312.
72. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R: **Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial**. *Mol Syst Biol* 2008, **4**:222.
73. Addona TA, Abbatiello SE, Schilling B, Skates SJ, Mani DR, Bunk DM, Spiegelman CH, Zimmerman LJ, Ham AJ, Keshishian H et al: **Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma**. *Nat Biotechnol* 2009, **27**(7):633-641.
74. Geromanos SJ, Vissers JP, Silva JC, Dorschel CA, Li GZ, Gorenstein MV, Bateman RH, Langridge JJ: **The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS**. *Proteomics* 2009, **9**(6):1683-1695.
75. Geiger T, Cox J, Mann M: **Proteomics on an Orbitrap benchtop mass spectrometer using all-ion fragmentation**. *Mol Cell Proteomics* 2010, **9**(10):2252-2261.
76. Venable JD, Dong MQ, Wohlschlegel J, Dillin A, Yates JR: **Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra**. *Nat Methods* 2004, **1**(1):39-45.
77. Panchaud A, Scherl A, Shaffer SA, von Haller PD, Kulasekara HD, Miller SI, Goodlett DR: **Precursor acquisition independent from ion count: how to dive deeper into the proteomics ocean**. *Anal Chem* 2009, **81**(15):6481-6488.
78. Ahrens CH, Brunner E, Qeli E, Basler K, Aebersold R: **Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**(11):789-801.
79. Brunner E, Ahrens CH, Mohanty S, Baetschmann H, Loevenich S, Potthast F, Deutsch EW, Panse C, de Lichtenberg U, Rinner O et al: **A high-quality catalog of the *Drosophila melanogaster* proteome**. *Nat Biotechnol* 2007, **25**(5):576-583.
80. Beck M, Schmidt A, Malmstroem J, Claassen M, Ori A, Szymborska A, Herzog F, Rinner O, Ellenberg J, Aebersold R: **The quantitative proteome of a human cell line**. *Mol Syst Biol* 2011, **7**:549.
81. Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R: **Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans***. *Nature* 2009, **460**(7256):762-765.

82. Schwanhaussner B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M: **Global quantification of mammalian gene expression control.** *Nature* 2011, **473**(7347):337-342.
83. Schmidt A, Beck M, Malmstrom J, Lam H, Claassen M, Campbell D, Aebersold R: **Absolute quantification of microbial proteomes at different states by directed mass spectrometry.** *Mol Syst Biol* 2011, **7**:510.
84. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.** *Nat Protoc* 2009, **4**(1):44-57.
85. Ma'ayan A: **Network integration and graph analysis in mammalian molecular systems biology.** *IET Syst Biol* 2008, **2**(5):206-221.
86. Gehlenborg N, O'Donoghue SI, Baliga NS, Goesmann A, Hibbs MA, Kitano H, Kohlbacher O, Neuweger H, Schneider R, Tenenbaum D *et al*: **Visualization of omics data for systems biology.** *Nat Methods* 2010, **7**(3 Suppl):S56-68.
87. Bensimon A, Heck AJ, Aebersold R: **Mass spectrometry-based proteomics and network biology.** *Annu Rev Biochem* 2012, **81**:379-405.
88. Geiger T, Wehner A, Schaab C, Cox J, Mann M: **Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins.** *Mol Cell Proteomics* 2012, **11**(3):M111 014050.
89. Conrads KA, Yu LR, Lucas DA, Zhou M, Chan KC, Simpson KA, Schaefer CF, Issaq HJ, Veenstra TD, Beck GR, Jr. *et al*: **Quantitative proteomic analysis of inorganic phosphate-induced murine MC3T3-E1 osteoblast cells.** *Electrophoresis* 2004, **25**(9):1342-1352.
90. Wasinger VC, Corthals GL: **Proteomic tools for biomedicine.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002, **771**(1-2):33-48.
91. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S *et al*: **Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**(12):1154-1169.
92. Fenselau C, Yao X: **Proteolytic labeling with 18O for comparative proteomics studies: preparation of 18O-labeled peptides and the 18O/16O peptide mixture.** *Methods Mol Biol* 2007, **359**:135-142.
93. Oda Y, Huang K, Cross FR, Cowburn D, Chait BT: **Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(12):6591-6596.
94. Conrads TP, Alving K, Veenstra TD, Belov ME, Anderson GA, Anderson DJ, Lipton MS, Pasa-Tolic L, Udseth HR, Chrisler WB *et al*: **Quantitative analysis of bacterial and mammalian proteomes using a combination of cysteine affinity tags and 15N-metabolic labeling.** *Anal Chem* 2001, **73**(9):2132-2139.
95. Krijgsveld J, Ketting RF, Mahmoudi T, Johansen J, Artal-Sanz M, Verrijzer CP, Plasterk RH, Heck AJ: **Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics.** *Nat Biotechnol* 2003, **21**(8):927-931.
96. Nelson CJ, Huttlin EL, Hegeman AD, Harms AC, Sussman MR: **Implications of 15N-metabolic labeling for automated peptide identification in *Arabidopsis thaliana*.** *Proteomics* 2007, **7**(8):1279-1292.
97. Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE, Matthews DE, Yates JR, 3rd: **Metabolic labeling of mammalian organisms with stable isotopes for quantitative proteomic analysis.** *Anal Chem* 2004, **76**(17):4951-4959.

98. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M: **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2002, **1**(5):376-386.
99. Cox J, Mann M: **MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**(12):1367-1372.
100. Sury MD, Chen JX, Selbach M: **The SILAC fly allows for accurate protein quantification in vivo.** *Mol Cell Proteomics* 2010, **9**(10):2173-2183.
101. Kruger M, Moser M, Ussar S, Thievensen I, Lubner CA, Forner F, Schmidt S, Zanivan S, Fassler R, Mann M: **SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function.** *Cell* 2008, **134**(2):353-364.
102. Van Hoof D, Pinkse MW, Oostwaard DW, Mummery CL, Heck AJ, Krijgsveld J: **An experimental correction for arginine-to-proline conversion artifacts in SILAC-based quantitative proteomics.** *Nat Methods* 2007, **4**(9):677-678.
103. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R: **Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.** *Nat Biotechnol* 1999, **17**(10):994-999.
104. Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F: **A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels.** *Proteomics* 2005, **5**(1):4-15.
105. Boersema PJ, Aye TT, van Veen TA, Heck AJ, Mohammed S: **Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates.** *Proteomics* 2008, **8**(22):4624-4632.
106. Hsu JL, Huang SY, Chow NH, Chen SH: **Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics.** *Anal Chem* 2003, **75**(24):6843-6852.
107. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S et al: **Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**(12):1154-1169.
108. Thompson A, Schafer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T, Johnstone R, Mohammed AK, Hamon C: **Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS.** *Anal Chem* 2003, **75**(8):1895-1904.
109. McAlister GC, Huttlin EL, Haas W, Ting L, Jedrychowski MP, Rogers JC, Kuhn K, Pike I, Grothe RA, Blethrow JD et al: **Increasing the multiplexing capacity of TMTs using reporter ion isotopologues with isobaric masses.** *Anal Chem* 2012, **84**(17):7469-7478.
110. Koehler CJ, Strozynski M, Kozielski F, Treumann A, Thiede B: **Isobaric peptide termini labeling for MS/MS-based quantitative proteomics.** *J Proteome Res* 2009, **8**(9):4333-4341.
111. Desiderio DM, Kai M: **Preparation of stable isotope-incorporated peptide internal standards for field desorption mass spectrometry quantification of peptides in biologic tissue.** *Biomed Mass Spectrom* 1983, **10**(8):471-479.
112. Mirgorodskaya OA, Kozmin YP, Titov MI, Korner R, Sonksen CP, Roepstorff P: **Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using (18)O-labeled internal standards.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000, **14**(14):1226-1232.

113. Schnolzer M, Jedrzejewski P, Lehmann WD: **Protease-catalyzed incorporation of 18O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.** *Electrophoresis* 1996, **17**(5):945-953.
114. Voyksner RD, Lee H: **Investigating the use of an octupole ion guide for ion storage and high-pass mass filtering to improve the quantitative performance of electrospray ion trap mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999, **13**(14):1427-1437.
115. Wiener MC, Sachs JR, Deyanova EG, Yates NA: **Differential mass spectrometry: a label-free LC-MS method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures.** *Anal Chem* 2004, **76**(20):6085-6096.
116. Liu H, Sadygov RG, Yates JR, 3rd: **A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics.** *Anal Chem* 2004, **76**(14):4193-4201.
117. Zhang S, Wu Q, Shan Y, Zhao Q, Zhao B, Weng Y, Sui Z, Zhang L, Zhang Y: **Fast MS/MS acquisition without dynamic exclusion enables precise and accurate quantification of proteome by MS/MS fragment intensity.** *Sci Rep* 2016, **6**:26392.
118. Waanders LF, Hanke S, Mann M: **Top-down quantitation and characterization of SILAC-labeled proteins.** *J Am Soc Mass Spectrom* 2007, **18**(11):2058-2064.
119. Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP: **Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(12):6940-6945.
120. Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, Court M, Vandenesch F, Garin J: **Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2007, **6**(12):2139-2149.
121. Hanke S, Besir H, Oesterhelt D, Mann M: **Absolute SILAC for accurate quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level.** *J Proteome Res* 2008, **7**(3):1118-1130.
122. Singh S, Springer M, Steen J, Kirschner MW, Steen H: **FLEXIQuant: a novel tool for the absolute quantification of proteins, and the simultaneous identification and quantification of potentially modified peptides.** *J Proteome Res* 2009, **8**(5):2201-2210.
123. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M: **Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein.** *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**(9):1265-1272.
124. Lu P, Vogel C, Wang R, Yao X, Marcotte EM: **Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**(1):117-124.
125. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ: **Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition.** *Mol Cell Proteomics* 2006, **5**(1):144-156.
126. Beadle GW, Tatum EL: **Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1941, **27**(11):499-506.
127. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W *et al*: **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 2001, **409**(6822):860-921.

128. Hawkins RD, Hon GC, Ren B: **Next-generation genomics: an integrative approach.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**(7):476-486.
129. Zhou X, Ren L, Meng Q, Li Y, Yu Y, Yu J: **The next-generation sequencing technology and application.** *Protein Cell* 2010, **1**(6):520-536.
130. Le Provost F, Lillico S, Passet B, Young R, Whitelaw B, Vilotte JL: **Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis.** *Trends Biotechnol* 2010, **28**(3):134-141.
131. McPherson DD, Sirna SJ, Hiratzka LF, Thorpe L, Armstrong ML, Marcus ML, Kerber RE: **Coronary arterial remodeling studied by high-frequency epicardial echocardiography: an early compensatory mechanism in patients with obstructive coronary atherosclerosis.** *J Am Coll Cardiol* 1991, **17**(1):79-86.
132. Boutros M, Ahringer J: **The art and design of genetic screens: RNA interference.** *Nat Rev Genet* 2008, **9**(7):554-566.
133. Cazier JB, Tomlinson I: **General lessons from large-scale studies to identify human cancer predisposition genes.** *J Pathol* 2010, **220**(2):255-262.
134. Amberger J, Bocchini C, Hamosh A: **A new face and new challenges for Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM(R)).** *Hum Mutat* 2011, **32**(5):564-567.
135. Arkin AP, Schaffer DV: **Network news: innovations in 21st century systems biology.** *Cell* 2011, **144**(6):844-849.
136. Kreeger PK, Lauffenburger DA: **Cancer systems biology: a network modeling perspective.** *Carcinogenesis* 2010, **31**(1):2-8.
137. Pe'er D, Hacohen N: **Principles and strategies for developing network models in cancer.** *Cell* 2011, **144**(6):864-873.
138. Vidal M, Cusick ME, Barabasi AL: **Interactome networks and human disease.** *Cell* 2011, **144**(6):986-998.
139. Khatri P, Sirota M, Butte AJ: **Ten Years of Pathway Analysis: Current Approaches and Outstanding Challenges.** In: *PLoS Comput Biol.* vol. 8; 2012: e1002375.
140. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: **Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.** *Nucleic acids research* 2009, **37**(1):1-13.
141. Khatri P, Draghici S: **Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems.** *Bioinformatics* 2005, **21**(18):3587-3595.
142. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES *et al*: **Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(43):15545-15550.
143. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E *et al*: **PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes.** *Nature genetics* 2003, **34**(3):267-273.
144. Barry WT, Nobel AB, Wright FA: **Significance analysis of functional categories in gene expression studies: a structured permutation approach.** *Bioinformatics* 2005, **21**(9):1943-1949.
145. Jiang Z, Gentleman R: **Extensions to gene set enrichment.** *Bioinformatics* 2007, **23**(3):306-313.

146. Navarro P, Trevisan-Herraz M, Bonzon-Kulichenko E, Nunez E, Martinez-Acedo P, Perez-Hernandez D, Jorge I, Mesa R, Calvo E, Carrascal M *et al*: **General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling**. *J Proteome Res* 2014, **13**(3):1234-1247.
147. Foster LJ, de Hoog CL, Zhang Y, Zhang Y, Xie X, Mootha VK, Mann M: **A mammalian organelle map by protein correlation profiling**. In: *Cell*. vol. 125; 2006: 187-199.
148. Hansson J, Rafiee MR, Reiland S, Polo JM, Gehring J, Okawa S, Huber W, Hochedlinger K, Krijgsveld J: **Highly Coordinated Proteome Dynamics during Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotency**. In: *Cell Reports*. vol. 2; 2012: 1579-1592.
149. Wu Y, Williams EG, Dubuis S, Mottis A, Jovaisaite V, Houten SM, Argmann CA, Faridi P, Wolski W, Kutalik Z *et al*: **Multilayered Genetic and Omics Dissection of Mitochondrial Activity in a Mouse Reference Population**. In: *Cell*. vol. 158; 2014: 1415-1430.
150. Ihmels J, Friedlander G, Bergmann S, Sarig O, Ziv Y, Barkai N: **Revealing modular organization in the yeast transcriptional network**. *Nat Genet* 2002, **31**(4):370-377.
151. Ihmels J, Levy R, Barkai N: **Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae***. *Nat Biotechnol* 2004, **22**(1):86-92.
152. Wei H, Persson S, Mehta T, Srinivasasainagendra V, Chen L, Page GP, Somerville C, Loraine A: **Transcriptional coordination of the metabolic network in *Arabidopsis***. *Plant Physiol* 2006, **142**(2):762-774.
153. Sprinzak E, Cokus SJ, Yeates TO, Eisenberg D, Pellegrini M: **Detecting coordinated regulation of multi-protein complexes using logic analysis of gene expression**. *BMC Syst Biol* 2009, **3**:115.
154. Tanay A, Sharan R, Kupiec M, Shamir R: **Revealing modularity and organization in the yeast molecular network by integrated analysis of highly heterogeneous genome-wide data**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(9):2981-2986.
155. Gandhi SJ, Zenklusen D, Lionnet T, Singer RH: **Transcription of functionally related constitutive genes is not coordinated**. *Nat Struct Mol Biol* 2011, **18**(1):27-34.
156. Newman JR, Ghaemmaghami S, Ihmels J, Breslow DK, Noble M, DeRisi JL, Weissman JS: **Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise**. *Nature* 2006, **441**(7095):840-846.
157. Carmi S, Levanon EY, Eisenberg E: **Efficiency of complex production in changing environment**. *BMC Syst Biol* 2009, **3**:3.
158. Bar-Even A, Paulsson J, Maheshri N, Carmi M, O'Shea E, Pilpel Y, Barkai N: **Noise in protein expression scales with natural protein abundance**. *Nat Genet* 2006, **38**(6):636-643.
159. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS: **Global analysis of protein expression in yeast**. *Nature* 2003, **425**(6959):737-741.
160. Carmi S, Levanon EY, Havlin S, Eisenberg E: **Connectivity and expression in protein networks: proteins in a complex are uniformly expressed**. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2006, **73**(3 Pt 1):031909.

161. Marguerat S, Schmidt A, Codlin S, Chen W, Aebersold R, Bahler J: **Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in proliferating and quiescent cells.** *Cell* 2012, **151**(3):671-683.
162. Foster LJ, de Hoog CL, Zhang Y, Zhang Y, Xie X, Mootha VK, Mann M: **A mammalian organelle map by protein correlation profiling.** *Cell* 2006, **125**(1):187-199.
163. Hansson J, Rafiee MR, Reiland S, Polo JM, Gehring J, Okawa S, Huber W, Hochedlinger K, Krijgsveld J: **Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency.** *Cell Rep* 2012, **2**(6):1579-1592.
164. Wu Y, Williams EG, Dubuis S, Mottis A, Jovaisaite V, Houten SM, Argmann CA, Faridi P, Wolski W, Kutalik Z *et al*: **Multilayered genetic and omics dissection of mitochondrial activity in a mouse reference population.** *Cell* 2014, **158**(6):1415-1430.
165. Garcia-Marques F, Trevisan-Herraz M, Martinez-Martinez S, Camafeita E, Jorge I, Lopez JA, Mendez-Barbero N, Mendez-Ferrer S, Del Pozo MA, Ibanez B *et al*: **A Novel Systems-Biology Algorithm for the Analysis of Coordinated Protein Responses Using Quantitative Proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2016, **15**(5):1740-1760.
166. Kaplan-Albuquerque N, Garat C, Van Putten V, Nemenoff RA: **Regulation of SM22 alpha expression by arginine vasopressin and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, **285**(4):H1444-1452.
167. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR: **Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease.** *Physiol Rev* 2004, **84**(3):767-801.
168. McGregor E, Kempster L, Wait R, Welson SY, Gosling M, Dunn MJ, Powel JT: **Identification and mapping of human saphenous vein medial smooth muscle proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.** *Proteomics* 2001, **1**(11):1405-1414.
169. Dupont A, Corseaux D, Dekeyzer O, Drobecq H, Guihot AL, Susen S, Vincentelli A, Amouyel P, Jude B, Pinet F: **The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells.** *Proteomics* 2005, **5**(2):585-596.
170. Boccardi C, Cecchetti A, Caselli A, Camici G, Evangelista M, Mercatanti A, Rainaldi G, Citti L: **A proteomic approach to the investigation of early events involved in vascular smooth muscle cell activation.** *Cell Tissue Res* 2007, **328**(1):185-195.
171. de la Cuesta F, Zubiri I, Maroto AS, Posada M, Padial LR, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Barderas MG: **Deregulation of smooth muscle cell cytoskeleton within the human atherosclerotic coronary media layer.** *J Proteomics* 2013, **82**:155-165.
172. Rocchiccioli S, Citti L, Boccardi C, Ucciferri N, Tedeschi L, Lande C, Trivella MG, Cecchetti A: **A gel-free approach in vascular smooth muscle cell proteome: perspectives for a better insight into activation.** *Proteome Sci* 2010, **8**:15.
173. Gao BB, Stuart L, Feener EP: **Label-free quantitative analysis of one-dimensional PAGE LC/MS/MS proteome: application on angiotensin II-stimulated smooth muscle cells secretome.** *Mol Cell Proteomics* 2008, **7**(12):2399-2409.
174. Celis JE, Gromov P: **2D protein electrophoresis: can it be perfected?** *Curr Opin Biotechnol* 1999, **10**(1):16-21.

175. Lim JJ, Liu YH, Khin ES, Bian JS: **Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, **295**(5):C1261-1270.
176. Brisset AC, Hao H, Camenzind E, Bacchetta M, Geinoz A, Sanchez JC, Chaponnier C, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML: **Intimal smooth muscle cells of porcine and human coronary artery express S100A4, a marker of the rhomboid phenotype in vitro.** *Circ Res* 2007, **100**(7):1055-1062.
177. Padro T, Pena E, Garcia-Arguinzonis M, Llorente-Cortes V, Badimon L: **Low-density lipoproteins impair migration of human coronary vascular smooth muscle cells and induce changes in the proteomic profile of myosin light chain.** *Cardiovasc Res* 2008, **77**(1):211-220.
178. Taurin S, Seyrantepe V, Orlov SN, Tremblay TL, Thibault P, Bennett MR, Hamet P, Pshezhetsky AV: **Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio in cultured vascular smooth muscle cells.** *Circ Res* 2002, **91**(10):915-922.
179. Mayr U, Mayr M, Yin X, Begum S, Tarelli E, Wait R, Xu Q: **Proteomic dataset of mouse aortic smooth muscle cells.** *Proteomics* 2005, **5**(17):4546-4557.
180. Rattan S, Ali M: **Role of SM22 in the differential regulation of phasic vs. tonic smooth muscle.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015, **308**(7):G605-612.
181. Ray JL, Leach R, Herbert JM, Benson M: **Isolation of vascular smooth muscle cells from a single murine aorta.** *Methods Cell Sci* 2001, **23**(4):185-188.
182. Barja F, Coughlin C, Belin D, Gabbiani G: **Actin isoform synthesis and mRNA levels in quiescent and proliferating rat aortic smooth muscle cells in vivo and in vitro.** *Lab Invest* 1986, **55**(2):226-233.
183. Porta S, Serra SA, Huch M, Valverde MA, Llorens F, Estivill X, Arbones ML, Marti E: **RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration.** *Hum Mol Genet* 2007, **16**(9):1039-1050.
184. Fuentes JJ, Pritchard MA, Estivill X: **Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene.** *Genomics* 1997, **44**(3):358-361.
185. Casas C, Martinez S, Pritchard MA, Fuentes JJ, Nadal M, Guimera J, Arbones M, Florez J, Soriano E, Estivill X et al: **Dscr1, a novel endogenous inhibitor of calcineurin signaling, is expressed in the primitive ventricle of the heart and during neurogenesis.** *Mech Dev* 2001, **101**(1-2):289-292.
186. Bonzon-Kulichenko E, Perez-Hernandez D, Nunez E, Martinez-Acedo P, Navarro P, Trevisan-Herraz M, Ramos Mdel C, Sierra S, Martinez-Martinez S, Ruiz-Meana M et al: **A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by 18O labeling.** *Mol Cell Proteomics* 2011, **10**(1):M110 003335.
187. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M: **In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes.** *Nat Protoc* 2006, **1**(6):2856-2860.
188. Katayama H, Tabata T, Ishihama Y, Sato T, Oda Y, Nagasu T: **Efficient in-gel digestion procedure using 5-cyclohexyl-1-pentyl-beta-D-maltoside as an additive for gel-based membrane proteomics.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004, **18**(20):2388-2394.

189. Lopez-Ferrer D, Martinez-Bartolome S, Villar M, Campillos M, Martin-Maroto F, Vazquez J: **Statistical model for large-scale peptide identification in databases from tandem mass spectra using SEQUEST.** *Anal Chem* 2004, **76**(23):6853-6860.
190. Navarro P, JS VZ: **A refined method to calculate False Discovery Rates for peptide identification using decoy databases.** *J Proteome Res* 2009.
191. Martinez-Bartolome S, Navarro P, Martin-Maroto F, Lopez-Ferrer D, Ramos-Fernandez A, Villar M, Garcia-Ruiz JP, Vazquez J: **Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method.** *Mol Cell Proteomics* 2008, **7**(6):1135-1145.
192. Bonzon-Kulichenko E, García-Marques F, Trevisan-Herraz M, Vázquez J: **Revisiting peptide identification by high-accuracy mass spectrometry: problems associated to the use of narrow mass precursor windows.** *Journal of Proteome Research* 2014.
193. Jorge I, Navarro P, Martinez-Acedo P, Nunez E, Serrano H, Alfranca A, Redondo JM, Vazquez J: **Statistical model to analyze quantitative proteomics data obtained by 18O/16O labeling and linear ion trap mass spectrometry: application to the study of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in endothelial cells.** *Mol Cell Proteomics* 2009, **8**(5):1130-1149.
194. Garcia-Marques F, Trevisan-Herraz M, Martinez-Martinez S, Camafeita E, Jorge I, Lopez JA, Mendez-Barbero N, Mendez-Ferrer S, Del Pozo MA, Ibanez B *et al*: **A novel systems-biology algorithm for the analysis of coordinated protein responses using quantitative proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2016.
195. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK *et al*: **A network-based analysis of systemic inflammation in humans.** *Nature* 2005, **437**(7061):1032-1037.
196. Ficenec D, Osborne M, Pradines J, Richards D, Felciano R, Cho RJ, Chen RO, Liefeld T, Owen J, Ruttenberg A *et al*: **Computational knowledge integration in biopharmaceutical research.** *Brief Bioinform* 2003, **4**(3):260-278.
197. Ruepp A, Brauner B, Dunger-Kaltenbach I, Frishman G, Montrone C, Stransky M, Waegelé B, Schmidt T, Doudieu ON, Stumpflen V *et al*: **CORUM: the comprehensive resource of mammalian protein complexes.** *Nucleic acids research* 2008, **36**(Database issue):D646-650.
198. Cogliati S, Calvo E, Loureiro M, Guaras AM, Nieto-Arellano R, Garcia-Poyatos C, Ezkurdia I, Mercader N, Vázquez J, Enriquez JA: **Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV.** *Nature* 2016, **539**(7630):579-582.
199. Eng JK, Jahan TA, Hoopmann MR: **Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool.** *Proteomics* 2013, **13**(1):22-24.
200. Picotti P, Bodenmiller B, Mueller LN, Domon B, Aebersold R: **Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics.** *Cell* 2009, **138**(4):795-806.
201. de Godoy LM, Olsen JV, Cox J, Nielsen ML, Hubner NC, Frohlich F, Walther TC, Mann M: **Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast.** *Nature* 2008, **455**(7217):1251-1254.
202. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ: **Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition.** *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2006, **5**(1):144-156.

203. Kamada S, Kakunaga T: **The nucleotide sequence of a human smooth muscle alpha-actin (aortic type) cDNA.** *Nucleic acids research* 1989, **17**(4):1767.
204. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, Madugundu AK, Kelkar DS, Isserlin R, Jain S *et al*: **A draft map of the human proteome.** *Nature* 2014, **509**(7502):575-581.
205. Geiger T, Velic A, Macek B, Lundberg E, Kampf C, Nagaraj N, Uhlen M, Cox J, Mann M: **Initial quantitative proteomic map of 28 mouse tissues using the SILAC mouse.** *Mol Cell Proteomics* 2013, **12**(6):1709-1722.
206. Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Moghaddas Gholami A, Lieberenz M, Savitski MM, Ziegler E, Butzmann L, Gessulat S, Marx H *et al*: **Mass-spectrometry-based draft of the human proteome.** *Nature* 2014, **509**(7502):582-587.
207. Wisniewski JR, Hein MY, Cox J, Mann M: **A "Proteomic Ruler" for Protein Copy Number and Concentration Estimation without Spike-in Standards.** *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2014, **13**(12):3497-3506.
208. Warringer J, Blomberg A: **Evolutionary constraints on yeast protein size.** *BMC Evol Biol* 2006, **6**:61.
209. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A: **PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function.** *Genome research* 2003, **13**(9):2129-2141.
210. Hu ZW, Kerb R, Shi XY, Wei-Lavery T, Hoffman BB: **Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells.** *J Pharmacol Exp Ther* 2002, **303**(2):563-573.
211. Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, Farber CR, Sinsheimer J, Kang HM, Furlotte N *et al*: **Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse.** *PLoS Genet* 2011, **7**(6):e1001393.
212. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM: **Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall.** *Circulation research* 1991, **68**(2):450-456.
213. Dubey RK, Jackson EK, Luscher TF: **Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors.** *The Journal of clinical investigation* 1995, **96**(1):141-149.
214. Simonis N, Gonze D, Orsi C, van Helden J, Wodak SJ: **Modularity of the transcriptional response of protein complexes in yeast.** *Journal of molecular biology* 2006, **363**(2):589-610.
215. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.** *Nature* 1997, **389**(6648):251-260.
216. Zaric B, Chami M, Remigy H, Engel A, Ballmer-Hofer K, Winkler FK, Kambach C: **Reconstitution of two recombinant LSm protein complexes reveals aspects of their architecture, assembly, and function.** *J Biol Chem* 2005, **280**(16):16066-16075.
217. Pillai RS, Grimm M, Meister G, Will CL, Luhrmann R, Fischer U, Schumperli D: **Unique Sm core structure of U7 snRNPs: assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing.** *Genes & development* 2003, **17**(18):2321-2333.

218. Somlyo AP, Somlyo AV: **Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase.** *Physiological reviews* 2003, **83**(4):1325-1358.
219. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: **Small GTP-binding proteins.** *Physiological reviews* 2001, **81**(1):153-208.
220. Ohtsu H, Mifune M, Frank GD, Saito S, Inagami T, Kim-Mitsuyama S, Takuwa Y, Sasaki T, Rothstein JD, Suzuki H et al: **Signal-crosstalk between Rho/ROCK and c-Jun NH2-terminal kinase mediates migration of vascular smooth muscle cells stimulated by angiotensin II.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005, **25**(9):1831-1836.
221. Spang A, Herrmann JM, Hamamoto S, Schekman R: **The ADP ribosylation factor-nucleotide exchange factors Gea1p and Gea2p have overlapping, but not redundant functions in retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum.** *Molecular biology of the cell* 2001, **12**(4):1035-1045.
222. Nishiya N, Kiosses WB, Han J, Ginsberg MH: **An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells.** *Nature cell biology* 2005, **7**(4):343-352.
223. Santy LC, Casanova JE: **Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D.** *The Journal of cell biology* 2001, **154**(3):599-610.
224. Gimona M, Kaverina I, Resch GP, Vignat E, Burgstaller G: **Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells.** *Molecular biology of the cell* 2003, **14**(6):2482-2491.
225. Fluck M, Mund SI, Schittny JC, Klossner S, Durieux AC, Giraud MN: **Mechano-regulated tenascin-C orchestrates muscle repair.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(36):13662-13667.
226. Yabkowitz R, Mansfield PJ, Ryan US, Suchard SJ: **Thrombospondin mediates migration and potentiates platelet-derived growth factor-dependent migration of calf pulmonary artery smooth muscle cells.** *Journal of cellular physiology* 1993, **157**(1):24-32.
227. Koyama H, Raines EW, Bornfeldt KE, Roberts JM, Ross R: **Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors.** *Cell* 1996, **87**(6):1069-1078.
228. Coxon A, Maundrell K, Kearsey SE: **Fission yeast cdc21+ belongs to a family of proteins involved in an early step of chromosome replication.** *Nucleic acids research* 1992, **20**(21):5571-5577.
229. Hu B, Burkhart R, Schulte D, Musahl C, Knippers R: **The P1 family: a new class of nuclear mammalian proteins related to the yeast Mcm replication proteins.** *Nucleic acids research* 1993, **21**(23):5289-5293.
230. Lacey JM, Wilmore DW: **Is glutamine a conditionally essential amino acid?** *Nutrition reviews* 1990, **48**(8):297-309.
231. Chiang JK, Sung ML, Yu HR, Chang HI, Kuo HC, Tsai TC, Yen CK, Chen CN: **Homocysteine induces smooth muscle cell proliferation through differential regulation of cyclins A and D1 expression.** *J Cell Physiol* 2011, **226**(4):1017-1026.
232. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP: **S-Adenosylmethionine and methylation.** *FASEB journal : official publication of*

- the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1996, **10**(4):471-480.
233. Lindsay H, Adams RL: **Spreading of methylation along DNA**. *The Biochemical journal* 1996, **320** (Pt 2):473-478.
 234. Strahl BD, Grant PA, Briggs SD, Sun ZW, Bone JR, Caldwell JA, Mollah S, Cook RG, Shabanowitz J, Hunt DF *et al*: **Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression**. *Molecular and cellular biology* 2002, **22**(5):1298-1306.
 235. Davis CD, Ross SA: **Dietary components impact histone modifications and cancer risk**. *Nutrition reviews* 2007, **65**(2):88-94.
 236. Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD: **Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains**. *Molecular cell* 2003, **12**(6):1591-1598.
 237. Gasque P, Neal JW, Singhrao SK, McGreal EP, Dean YD, Van BJ, Morgan BP: **Roles of the complement system in human neurodegenerative disorders: pro-inflammatory and tissue remodeling activities**. *Mol Neurobiol* 2002, **25**(1):1-17.
 238. Lin ZH, Fukuda N, Jin XQ, Yao EH, Ueno T, Endo M, Saito S, Matsumoto K, Mugishima H: **Complement 3 is involved in the synthetic phenotype and exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats**. *Hypertension* 2004, **44**(1):42-47.
 239. Dzau VJ: **Mechanism of protective effects of ACE inhibition on coronary artery disease**. *European heart journal* 1998, **19** Suppl J:J2-6.
 240. Shimokawa H, Satoh K: **Light and Dark of Reactive Oxygen Species for Vascular Function**. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2014.
 241. Shimokawa H, Satoh K: **Vascular function**. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014, **34**(11):2359-2362.
 242. Paul RJ: **Smooth muscle energetics**. *Annual review of physiology* 1989, **51**:331-349.
 243. Yang H, Ara AI, Magilnick N, Xia M, Ramani K, Chen H, Lee TD, Mato JM, Lu SC: **Expression pattern, regulation, and functions of methionine adenosyltransferase 2beta splicing variants in hepatoma cells**. *Gastroenterology* 2008, **134**(1):281-291.
 244. Zahradka P, Werner JP, Buhay S, Litchie B, Helwer G, Thomas S: **NF-kappaB activation is essential for angiotensin II-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells**. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2002, **34**(12):1609-1621.
 245. Volanakis JE: **Transcriptional regulation of complement genes**. *Annual review of immunology* 1995, **13**:277-305.
 246. Dai G, Vaughn S, Zhang Y, Wang ET, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA, Jr.: **Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2**. *Circulation research* 2007, **101**(7):723-733.
 247. Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, Wasserman MA, Medford RM, Jaiswal AK, Kunsch C: **Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism**. *J Biol Chem* 2003, **278**(2):703-711.

248. Kim YJ, Ahn JY, Liang P, Ip C, Zhang Y, Park YM: **Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: implication to tumor biology.** *Cancer Res* 2007, **67**(2):546-554.
249. Lloyd PG, Hardin CD: **Role of microtubules in the regulation of metabolism in isolated cerebral microvessels.** *The American journal of physiology* 1999, **277**(6 Pt 1):C1250-1262.
250. Lloyd PG, Hardin CD: **Sorting of metabolic pathway flux by the plasma membrane in cerebrovascular smooth muscle cells.** *American journal of physiology Cell physiology* 2000, **278**(4):C803-811.
251. Jitrapakdee S: **Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2012, **44**(1):33-45.
252. Sharifi BG, LaFleur DW, Pirola CJ, Forrester JS, Fagin JA: **Angiotensin II regulates tenascin gene expression in vascular smooth muscle cells.** *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**(33):23910-23915.
253. Majack RA, Mildbrandt J, Dixit VM: **Induction of thrombospondin messenger RNA levels occurs as an immediate primary response to platelet-derived growth factor.** *J Biol Chem* 1987, **262**(18):8821-8825.
254. Scott-Burden T, Resink TJ, Hahn AW, Buhler FR: **Induction of thrombospondin expression in vascular smooth muscle cells by angiotensin II.** *Journal of cardiovascular pharmacology* 1990, **16** Suppl 7:S17-20.
255. Mouneimne G, Hansen SD, Selfors LM, Petrak L, Hickey MM, Gallegos LL, Simpson KJ, Lim J, Gertler FB, Hartwig JH *et al*: **Differential remodeling of actin cytoskeleton architecture by profilin isoforms leads to distinct effects on cell migration and invasion.** *Cancer cell* 2012, **22**(5):615-630.
256. Tokuo H, Ikebe M: **Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia.** *Biochemical and biophysical research communications* 2004, **319**(1):214-220.
257. Zhang H, Berg JS, Li Z, Wang Y, Lang P, Sousa AD, Bhaskar A, Cheney RE, Stromblad S: **Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton.** *Nature cell biology* 2004, **6**(6):523-531.
258. Kerber ML, Jacobs DT, Campagnola L, Dunn BD, Yin T, Sousa AD, Quintero OA, Cheney RE: **A novel form of motility in filopodia revealed by imaging myosin-X at the single-molecule level.** *Current biology : CB* 2009, **19**(11):967-973.
259. Hsieh CC, Lau Y: **Migration of vascular smooth muscle cells is enhanced in cultures derived from spontaneously hypertensive rat.** *Pflugers Arch* 1998, **435**(2):286-292.
260. Xia C, Bao Z, Tabassam F, Ma W, Qiu M, Hua S, Liu M: **GCIP, a novel human gap2 and cyclin D interacting protein, regulates E2F-mediated transcriptional activity.** *J Biol Chem* 2000, **275**(27):20942-20948.
261. Chang TW, Chen CC, Chen KY, Su JH, Chang JH, Chang MC: **Ribosomal phosphoprotein P0 interacts with GCIP and overexpression of P0 is associated with cellular proliferation in breast and liver carcinoma cells.** *Oncogene* 2008, **27**(3):332-338.
262. Lee KM, Seo HY, Kim MK, Min AK, Ryu SY, Kim YN, Park YJ, Choi HS, Lee KU, Park WJ *et al*: **Orphan nuclear receptor small heterodimer partner inhibits angiotensin II- stimulated PAI-1 expression in vascular smooth muscle cells.** *Experimental & molecular medicine* 2010, **42**(1):21-29.

263. di Gioia CR, van de Greef WM, Sperti G, Castoldi G, Todaro N, Ierardi C, Pieruzzi F, Stella A: **Angiotensin II increases calponin expression in cultured rat vascular smooth muscle cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **279**(3):965-969.
264. Turla MB, Thompson MM, Corjay MH, Owens GK: **Mechanisms of angiotensin II- and arginine vasopressin-induced increases in protein synthesis and content in cultured rat aortic smooth muscle cells. Evidence for selective increases in smooth muscle isoactin expression.** *Circ Res* 1991, **68**(1):288-299.
265. Ohtsu H, Suzuki H, Nakashima H, Dhobale S, Frank GD, Motley ED, Eguchi S: **Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: mechanism and significance in vascular smooth muscle cells.** *Hypertension* 2006, **48**(4):534-540.
266. Rattan S, Puri RN, Fan YP: **Involvement of rho and rho-associated kinase in sphincteric smooth muscle contraction by angiotensin II.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2003, **228**(8):972-981.
267. Duff JL, Berk BC, Corson MA: **Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **188**(1):257-264.
268. Ishida Y, Kawahara Y, Tsuda T, Koide M, Yokoyama M: **Involvement of MAP kinase activators in angiotensin II-induced activation of MAP kinases in cultured vascular smooth muscle cells.** *FEBS Lett* 1992, **310**(1):41-45.
269. Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S: **Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling.** *Circ Res* 1995, **76**(1):1-15.
270. Fukuda K, Izumo S: **Angiotensin II potentiates DNA synthesis in AT-1 transformed cardiomyocytes.** *J Mol Cell Cardiol* 1998, **30**(10):2069-2080.
271. Elliott ME: **Phosphorylation of adrenal histone H3 is affected by angiotensin, ACTH, dibutyryl cAMP, and atrial natriuretic peptide.** *Life Sci* 1990, **46**(20):1479-1488.
272. Xu X, Ha CH, Wong C, Wang W, Hausser A, Pfizenmaier K, Olson EN, McKinsey TA, Jin ZG: **Angiotensin II stimulates protein kinase D-dependent histone deacetylase 5 phosphorylation and nuclear export leading to vascular smooth muscle cell hypertrophy.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**(11):2355-2362.
273. Chu CH, Lo JF, Hu WS, Lu RB, Chang MH, Tsai FJ, Tsai CH, Weng YS, Tzang BS, Huang CY: **Histone acetylation is essential for ANG-II-induced IGF-IIR gene expression in H9c2 cardiomyoblast cells and pathologically hypertensive rat heart.** *Journal of cellular physiology* 2012, **227**(1):259-268.
274. Adiguzel E, Hou G, Sabatini PJ, Bendeck MP: **Type VIII collagen signals via beta1 integrin and RhoA to regulate MMP-2 expression and smooth muscle cell migration.** *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2013, **32**(6):332-341.
275. Adiguzel E, Hou G, Mulholland D, Hopfer U, Fukai N, Olsen B, Bendeck M: **Migration and growth are attenuated in vascular smooth muscle cells with type VIII collagen-null alleles.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26**(1):56-61.

276. Wang W, Huang XR, Canlas E, Oka K, Truong LD, Deng C, Bhowmick NA, Ju W, Bottinger EP, Lan HY: **Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis**. *Circ Res* 2006, **98**(8):1032-1039.
277. Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, Bonner R, Aebersold R: **Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis**. *Molecular & Cellular Proteomics* 2012, **11**(6):O111. 016717.278. Phillips A, Cardelli L: **A programming language for composable DNA circuits**. *J R Soc Interface* 2009, **6** Suppl 4:S419-436.
279. Jorge I, Navarro P, Martinez-Acedo P, Nunez E, Serrano H, Alfranca A, Redondo JM, Vazquez J: **Statistical model to analyze quantitative proteomics data obtained by 18O/16O labeling and linear ion trap mass spectrometry: application to the study of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in endothelial cells**. *Mol Cell Proteomics* 2009, **8**(5):1130-1149.
280. Fuentes JJ, Genesca L, Kingsbury TJ, Cunningham KW, Perez-Riba M, Estivill X, de la Luna S: **DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways**. *Hum Mol Genet* 2000, **9**(11):1681-1690.
281. Vega RB, Yang J, Rothermel BA, Bassel-Duby R, Williams RS: **Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity**. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(33):30401-30407.
282. Peiris H, Dubach D, Jessup CF, Unterweger P, Raghupathi R, Muyderman H, Zanin MP, Mackenzie K, Pritchard MA, Keating DJ: **RCAN1 regulates mitochondrial function and increases susceptibility to oxidative stress in mammalian cells**. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014, **2014**:520316.
283. Martin KR, Corlett A, Dubach D, Mustafa T, Coleman HA, Parkinson HC, Merson TD, Bourne JA, Porta S, Arbones ML *et al*: **Over-expression of RCAN1 causes Down syndrome-like hippocampal deficits that alter learning and memory**. *Hum Mol Genet* 2012, **21**(13):3025-3041.
284. Ermak G, Harris CD, Battocchio D, Davies KJ: **RCAN1 (DSCR1 or Adapt78) stimulates expression of GSK-3beta**. *The FEBS journal* 2006, **273**(10):2100-2109.
285. Natarajan P, Priyadarshini V, Pradhan D, Manne M, Swargam S, Kanipakam H, Bhuma V, Amineni U: **E-pharmacophore-based virtual screening to identify GSK-3beta inhibitors**. *J Recept Signal Transduct Res* 2016, **36**(5):445-458.
286. Ermak G, Davies KJ: **Chronic high levels of the RCAN1-1 protein may promote neurodegeneration and Alzheimer disease**. *Free Radic Biol Med* 2013, **62**:47-51.
287. Kinnally KW, Antonsson B: **A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis**. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2007, **12**(5):857-868.
288. Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Miki T, Kouzu H, Yano T, Murase H, Tobisawa T, Ogasawara M, Horio Y *et al*: **Translocation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta), a trigger of permeability transition, is kinase activity-dependent and mediated by interaction with voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2)**. *J Biol Chem* 2014, **289**(42):29285-29296.
289. Maurya SR, Mahalakshmi R: **Modulation of human mitochondrial voltage-dependent anion channel 2 (hVDAC-2) structural stability by cysteine-assisted barrel-lipid interactions**. *J Biol Chem* 2013, **288**(35):25584-25592.

290. Brautigam L, Schutte LD, Godoy JR, Prozorovski T, Gellert M, Hauptmann G, Holmgren A, Lillig CH, Berndt C: **Vertebrate-specific glutaredoxin is essential for brain development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(51):20532-20537.
291. Kenchappa RS, Ravindranath V: **Glutaredoxin is essential for maintenance of brain mitochondrial complex I: studies with MPTP.** *Faseb J* 2003, **17**(6):717-719.
292. Clark J, Moore L, Krasinskas A, Way J, Battey J, Tamkun J, Kahn RA: **Selective amplification of additional members of the ADP-ribosylation factor (ARF) family: cloning of additional human and Drosophila ARF-like genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**(19):8952-8956.
293. Hodges JL, Vilchez SM, Asmussen H, Whitmore LA, Horwitz AR: **alpha-Actinin-2 mediates spine morphology and assembly of the post-synaptic density in hippocampal neurons.** *PLoS One* 2014, **9**(7):e101770.
294. Venhoranta H, Bauersachs S, Taponen J, Lohi H, Taira T, Andersson M, Kind A, Schnieke A, Flisikowski K: **Fetal growth restriction caused by MIMT1 deletion alters brain transcriptome in cattle.** *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2013, **31**(7):463-467.
295. Esteban V, Mendez-Barbero N, Jimenez-Borreguero LJ, Roque M, Novensa L, Garcia-Redondo AB, Salaices M, Vila L, Arbones ML, Campanero MR *et al*: **Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling.** *J Exp Med* 2011, **208**(10):2125-2139.
296. Esteban V, Mendez-Barbero N, Jimenez-Borreguero LJ, Roque M, Novensa L, Garcia-Redondo AB, Salaices M, Vila L, Arbones ML, Campanero MR *et al*: **Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling.** *J Exp Med* 2011, **208**(10):2125-2139.
297. Rouleau M, McDonald D, Gagne P, Ouellet ME, Droit A, Hunter JM, Dutertre S, Prigent C, Hendzel MJ, Poirier GG: **PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery.** *Journal of cellular biochemistry* 2007, **100**(2):385-401.
298. Tulin A, Spradling A: **Chromatin Loosening by Poly(ADP)-Ribose Polymerase (PARP) at Drosophila Puff Loci.** *Science* 2003, **299**(5606):560-562.
299. Yan W, Chen S, Huang J, Shen Y, Qiang B, Gu D: **Polymorphisms in PLIN and hypertension combined with obesity and lipid profiles in Han Chinese.** *Obes Res* 2004, **12**(11):1733-1737.
300. Acid SA: **Lehninger principles of biochemistry.** 2004.

ANEXOS

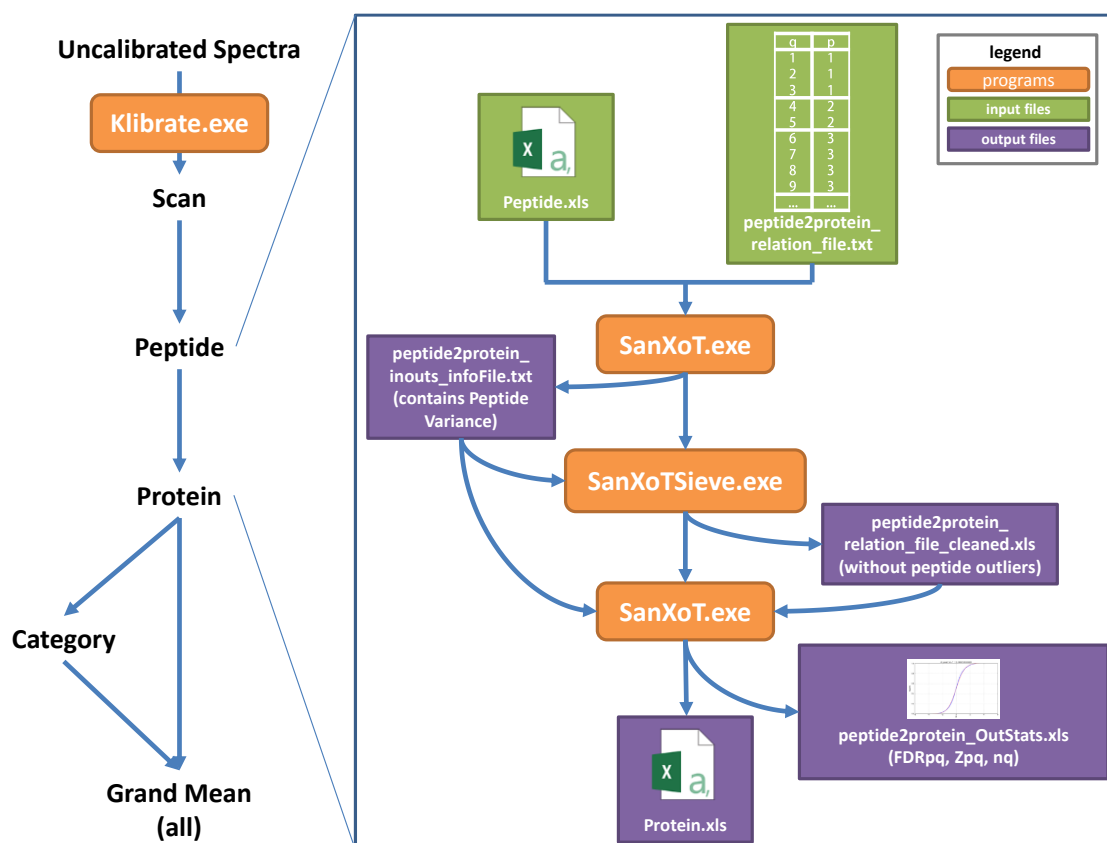


Figura Suplementaria 1. Esquema del flujo de trabajo del análisis estadístico. En la parte derecha se muestran los diferentes pasos de un flujo de trabajo convencional que incluye el Triángulo de Biología de Sistemas. En la parte izquierda, se detallan los archivos de entrada y salida de un paso concreto de integración. En verde, se marcan los archivos de entrada que utilizan los programas, en naranja; y en morado los archivos de salida.

Material Suplementario 1. Archivo Batch CMD. Flujo de trabajo empleado para análisis estadístico siguiendo el algoritmo general de integración (GIA), en el que está incluido el Triángulo de Biología de Sistemas (SBT) y en el que están explicados cada uno de los parámetros empleados.

```
REM Important: before performing the integration, change "full_path" by the path
containing data and relation tables
```

```
REM *****
REM ***** PART 1: integrations *****
REM ***** scan > peptide > protein *****
REM *****
```

```
REM Calibration of weights as in the WSPP model
REM Calculation of calibration constant k
REM k transforms uncalibrated weights into true weights (inverses of variances)
REM the suffix "_Calibrated" is automatically added to the filename
```

```
klibrate.exe -d"full_path/scan_Xs_Vs.txt" -
r"full_path/scan2peptide_relation_file.txt" -k1 -v0 -
o"full_path/scan_xs_vs_Calibrated.txt"
```

```
REM ***** Scan to peptide
```

```
REM initial scan>peptide integration
REM -v0 forces variance=0 as seed
REM -a sets the indicated prefix into the output file
```

```
sanxot.exe -d"full_path/scan_xs_vs_Calibrated.txt" -
r"full_path/scan2peptide_relation_file.txt" -v0 -a"scan2peptide_inouts"
REM removes scan outliers and generates a cleaned relation table without outliers
```

```

REM -V with infoFile gets variance from previous integration

sanxotsieve.exe -d"full_path/scan_Xs_Vs_Calibrated.txt" -
r"full_path/scan2peptide_relation_file.txt" -
V"full_path/scan_Xs_Vs_Calibrated_infoFile.txt" a-"scan2peptide_relation_file"

REM reintegrate scan>peptide
REM using variance calculated in previous integration
REM and the cleaned relation table (without outliers)
REM -f avoids variance recalculation (uses variance seed as final variance)
REM -o renames the output file
REM A file named "scan2peptide_OutStats.xls" is created

sanxot.exe -d"full_path/scan_Xs_Vs_Calibrated.txt" -
r"full_path/scan2peptide_relation_file_cleaned.xls" -
V"full_path/scan2peptide_inouts_infoFile.txt" -a"scan2peptide" -f -o"peptide.xls"

REM ***** Peptide to protein

REM initial peptide>protein integration

sanxot.exe -d"full_path/peptide.xls" -
r"full_path/peptide2protein_relation_file.txt" -v0 -a"peptide2protein_inouts"

REM remove peptide outliers as above

sanxotsieve.exe -d"full_path/peptide.xls" -
r"full_path/peptide2protein_relation_file.txt" -
V"full_path/peptide2protein_inouts_infoFile.txt" -a"peptide2protein_relation_file"

REM reintegrate peptide>protein after outlier removal as above
REM A file named "peptide2protein_OutStats.xls" is created

sanxot.exe -d"full_path/peptide.xls" -
r"full_path/peptide2protein_relation_file_cleaned.xls" -
V"full_path/scan2peptide_infoFile.txt" -a"peptide2protein" -f -o"protein.xls"

REM *****
REM ***** PART 2: Systems Biology Triangle *****
REM *****

REM ***** Protein to Category

REM initial protein>category integration
REM The output file is useful for statistics. It contains Zqc and FDRqc. By
default, this file is suffixed by "_outStats"

sanxot.exe -d"full_path/protein.xls" -
r"full_path/protein2category_relation_file.txt" -v0 -a"protein2category_inouts"

REM remove protein outliers within categories

sanxotsieve.exe -d"full_path/protein.xls" -
r"full_path/protein2category_relation_file.txt" -
V"full_path/protein2category_inouts_infoFile.txt" -
a"protein2category_relation_file"

REM reintegrate protein>category after outlier removal

sanxot.exe -d"full_path/protein.xls" -
r"full_path/protein2category_relation_file_cleaned.xls" -
V"full_path/protein2category_inouts_infoFile.txt" -a"protein2category" -f -
o"category.xls"

REM ***** Category to all

```

```
REM initial category>all integration
REM -C forces integration to all, obviating the use of a (category,all) relation
table
REM The output file is useful for statistics. It contains Zca and FDRca

sanxot.exe -d"full_path/category.xls" -C -v0 -f -a"category2all"

REM ***** Protein to all
REM The output file is useful for statistics. It contains Zqa and FDRqa

sanxot.exe -d"full_path/protein.xls" -C -V"full_path/protein2category_infoFile.txt"
-f -a"protein2all"

echo on
```

Tabla Suplementaria 1. Lista de categorías refinadas que cambian de manera coordinada

Categoría Representativa de Cluster Funcional (ID) ¹	Descripción del Fasta de la Proteína	Z _{qo} ²					FDR _{qc} ³				
		2h	4h	6h	8h	10h	2h	4h	6h	8h	10h
20S proteasome	»g Q8R1P4 PSA1_MOUSE Proteasome subunit alpha type 1 OS=Mus musculus GN-PsmA1 PE-1 SV=1	-2.446	-2.328	-2.054	-2.783	-2.032	0.43	0.34	0.55	0.79	0.89
	»g Q8R1P1 PSB2_MOUSE Proteasome subunit beta type 2 OS=Mus musculus GN-PsmB2 PE-1 SV=1	-1.377	-2.118	-1.939	-2.147	-2.008	0.81	0.86	0.95	0.94	0.83
	»g A9722 PSA2_MOUSE Proteasome subunit alpha type 2 OS=Mus musculus GN-PsmA2 PE-1 SV=2	-0.264	-1.714	-1.102	-1.8278	-0.896	1.00	0.99	1.01	1.00	1.00
	»g Q8R1P3 PSB2_MOUSE Proteasome subunit beta type 2 OS=Mus musculus GN-PsmB2 PE-1 SV=1	-1.038	-0.855	-1.479	-1.1459	-1.465	0.97	1.00	0.99	1.01	0.98
	»g O70453 PSA3_MOUSE Proteasome subunit alpha type 3 OS=Mus musculus GN-PsmA3 PE-1 SV=3	-0.639	-1.04	-1.025	-1.3246	-0.693	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	»g P59026 PSB4_MOUSE Proteasome subunit beta type 4 OS=Mus musculus GN-PsmB4 PE-1 SV=1	0.6864	-0.689	-0.777	-1.0204	-1.028	0.98	1.00	1.01	1.00	1.00
	»g O55234 PSB5_MOUSE Proteasome subunit beta type 5 OS=Mus musculus GN-PsmB5 PE-1 SV=3	-1.139	-0.833	-0.616	-1.0782	-0.991	0.96	1.00	1.01	1.01	1.00
	»g Q8ZJ1 PSA5_MOUSE Proteasome subunit alpha type 5 OS=Mus musculus GN-PsmA5 PE-1 SV=1	0.908	-0.157	-0.809	-1.2714	-0.73	0.93	0.98	1.01	1.00	1.00
	»g P70295 PSB7_MOUSE Proteasome subunit beta type 7 OS=Mus musculus GN-PsmB7 PE-1 SV=1	1.06	-0.449	-0.631	-0.7626	-0.684	0.92	1.00	1.01	1.00	1.00
	»g Q80685 PSB6_MOUSE Proteasome subunit beta type 6 OS=Mus musculus GN-PsmB6 PE-1 SV=3	-0.38	-0.254	-0.611	-0.9395	-0.566	1.01	1.00	1.01	1.00	1.00
	»g O90061 PSB1_MOUSE Proteasome subunit beta type 1 OS=Mus musculus GN-PsmB1 PE-1 SV=1	1.206	-0.496	-0.81	-0.4569	-0.426	0.88	1.00	1.01	0.98	1.00
	»g Q8ZJ00 PSA7_MOUSE Proteasome subunit alpha type 7 OS=Mus musculus GN-PsmA7 PE-1 SV=1	-0.228	-0.766	-0.802	-0.7142	0.2326	1.00	1.00	1.01	1.00	0.93
	»g Q8R1P5 PSA4_MOUSE Proteasome subunit alpha type 4 OS=Mus musculus GN-PsmA4 PE-1 SV=1	0.8581	-0.439	-0.743	-0.5976	-0.001	0.94	1.00	1.01	1.00	0.99
	»g Q8VHB3 Q8VHB3_MOUSE Proteasomal subunit beta type 10 (Fragment) OS=Mus musculus GN-PsmB3 PE-4 SV=1	-0.124	-0.144	-0.204	-0.1679	-0.319	1.01	1.00	1.01	1.00	1.00
	»g Q8QLM6 PSA5_MOUSE Proteasome subunit alpha type 6 OS=Mus musculus GN-PsmA6 PE-1 SV=1	0.9661	0.3156	0.0604	-0.409	0.506	0.92	0.87	0.95	0.99	0.85
	»g P63276 RS17_MOUSE 40S ribosomal protein S17 OS=Mus musculus GN-Rps17 PE-1 SV=2	-1.407	3.909	3.904	-4.2439	3.39	0.72	0.26	0.30	0.13	0.25
	»g Q8ZWJ5 RS9_MOUSE 40S ribosomal protein S9 OS=Mus musculus GN-Rps9 PE-1 SV=3	-0.953	-4.201	-1.842	-3.7091	-4.291	0.87	0.24	0.53	0.48	0.24
	»g P63262 RS12_MOUSE 40S ribosomal protein S20 OS=Mus musculus GN-Rps12 PE-1 SV=1	3.8388	-2.453	-4.053	-3.1947	3.396	0.59	0.59	0.6	0.29	0.36
	»g P63282 RS7_MOUSE 40S ribosomal protein S7 OS=Mus musculus GN-Rps7 PE-2 SV=1	-0.252	-2.437	-3.042	-4.2206	-2.371	0.99	0.99	0.88	0.22	1.00
	»g P62849 RS4_MOUSE 40S ribosomal protein S24 OS=Mus musculus GN-Rps24 PE-1 SV=1	-1.169	-2.932	-3.308	-2.9452	-2.52	0.86	0.72	0.64	0.68	0.89
»g P62270 RS18_MOUSE 40S ribosomal protein S18 OS=Mus musculus GN-Rps18 PE-1 SV=3	0.011	2.815	2.586	-2.7781	-1.328	1.01	0.86	0.97	0.87	0.66	
»g Q8V553 Q8V553_MOUSE 40S ribosomal protein S5 OS=Mus musculus GN-Rps15A PE-1 SV=1	3.3388	-2.25	-2.734	-3.37	3.386	0.87	0.55	0.51	0.28	0.28	
»g P62245 RS15A_MOUSE 40S ribosomal protein S15A OS=Mus musculus GN-Rps15A PE-2 SV=2	-0.835	-2.374	-2.713	-2.2663	-2.785	0.92	0.93	0.86	0.95	0.77	
»g P62858 RS28_MOUSE 40S ribosomal protein S28 OS=Mus musculus GN-Rps28 PE-1 SV=1	0.1868	-2.611	-1.732	-2.0083	3.538	1.00	0.75	1.00	0.96	0.25	
»g P62202 RS40_MOUSE 40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Mus musculus GN-Rps4a PE-2 SV=2	-1.135	-1.675	1.2831	-2.37	-2.438	0.80	1.00	0.96	1.00	1.00	
»g P62855 RS42_MOUSE 40S ribosomal protein S28 OS=Mus musculus GN-Rps42 PE-2 SV=3	-0.52	-1.441	-2.682	-2.7545	-3.321	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	
»g P62242 RS8_MOUSE 40S ribosomal protein S8 OS=Mus musculus GN-Rps8 PE-1 SV=2	-0.588	2.981	2.332	-1.8074	-1.109	0.94	0.79	0.99	1.01	1.00	
»g P97461 RS5_MOUSE 40S ribosomal protein S5 OS=Mus musculus GN-Rps5 PE-2 SV=3	-0.743	-2.737	-1.886	-1.4829	-1.888	0.93	0.88	1.01	1.01	1.00	
»g P62852 RS2_MOUSE 40S ribosomal protein S25 OS=Mus musculus GN-Rps25 PE-1 SV=1	0.3586	-0.9781	-2.778	-1.0051	-0.121	1.00	0.60	0.86	1.00	0.94	
»g Q8V729 Q8V729_MOUSE 40S ribosomal protein S15 OS=Mus musculus GN-Rps15 PE-2 SV=1	3.5686	-1.557	-1.829	-1.829	-1.829	0.94	0.58	0.52	0.52	0.52	
»g P62754 RS6_MOUSE 40S ribosomal protein S6 OS=Mus musculus GN-Rps6 PE-1 SV=1	0.5389	-1.307	-1.194	-1.3984	-2.031	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	
»g Q8CZ8 RS19_MOUSE 40S ribosomal protein S19 OS=Mus musculus GN-Rps19 PE-1 SV=3	1.0422	-1.524	-1.557	-1.2424	-1.375	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
»g P63323 RS12_MOUSE 40S ribosomal protein S20 OS=Mus musculus GN-Rps12 PE-1 SV=2	3.9384	-0.963	1.624	-2.226	-1.374	0.96	1.00	1.01	1.00	1.00	
»g P63235 RS12_MOUSE 40S ribosomal protein S20 OS=Mus musculus GN-Rps12 PE-1 SV=2	0.468	-3.589	-1.228	-3.9413	-1.431	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
»g P62274 RS9_MOUSE 40S ribosomal protein S20 OS=Mus musculus GN-Rps2 PE-2 SV=2	1.03	-0.758	-1.296	-0.7829	-1.721	0.98	1.00	1.01	0.90	0.90	
»g P97351 RS3A_MOUSE 40S ribosomal protein S3a OS=Mus musculus GN-Rps3a PE-1 SV=3	0.6296	-1.139	-0.725	-0.7529	-1.541	1.00	1.00	0.95	0.97	1.00	
»g P62281 RS1_MOUSE 40S ribosomal protein S25 OS=Mus musculus GN-Rps1 PE-2 SV=3	3.1278	-0.883	-1.429	-0.6947	-1.29	0.99	0.98	1.01	0.99	1.00	
»g P62267 RS2_MOUSE 40S ribosomal protein S23 OS=Mus musculus GN-Rps23 PE-1 SV=3	0.1745	-0.3	-0.528	-0.6951	-0.38	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	
»g P62908 RS3_MOUSE 40S ribosomal protein S3 OS=Mus musculus GN-Rps3 PE-1 SV=1	0.794	-0.819	-0.436	-0.9267	-0.97	1.00	0.96	0.84	0.99	0.98	
»g P62301 RS13_MOUSE 40S ribosomal protein S13 OS=Mus musculus GN-Rps13 PE-1 SV=2	4.75	-0.913	-1.408	-0.2182	-0.671	0.001	1.00	1.01	0.67	0.98	
»g P62843 RS15_MOUSE 40S ribosomal protein S15 OS=Mus musculus GN-Rps15 PE-2 SV=2	2.1883	-0.802	-1.009	-0.0178	0.1396	0.75	1.00	1.01	0.90	0.76	
»g P41431 RS16_MOUSE 40S ribosomal protein S16 OS=Mus musculus GN-Rps16 PE-2 SV=4	2.525	-1.638	-1.094	-0.6798	-0.4967	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	
»g P63867 RS20_MOUSE 40S ribosomal protein S20 OS=Mus musculus GN-Rps20 PE-1 SV=1	1.481	-0.099	-0.278	-0.1388	-1.035	0.92	0.94	0.97	0.98	1.00	
»g P62883 RS27A_MOUSE Ubiquitin OS=Mus musculus GN-Rps27a PE-1 SV=2	1.2404	0.2295	-0.861	-0.478	-0.415	0.95	0.93	1.01	1.01	1.00	
»r D3YU71 D3YU71_MOUSE 40S ribosomal protein S19 (Fragment) OS=Mus musculus GN-Rps19 PE-4 SV=1	0.2482	0.0006	-0.22	-0.13	-0.195	1.00	1.00	1.01	1.01	1.00	
»g Q8ZWJ9 RS27_MOUSE 40S ribosomal protein S27 OS=Mus musculus GN-Rps27 PE-1 SV=3	0.3348	-0.008	-0.002	-0.0251	0.539	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
»g P41430 RS4_MOUSE 40S ribosomal protein S4 OS=Mus musculus GN-Rps4 PE-1 SV=1	1.022	0.1336	0.1774	-0.4862	0.226	0.91	0.94	0.94	0.94	0.94	
»g P62844 RS4_MOUSE 40S ribosomal protein S14 OS=Mus musculus GN-Rps14 PE-1 SV=2	1.6699	0.3228	0.28	0.5929	0.177	0.92	0.94	0.94	0.84	0.77	
»g Q8CQD2 RS21_MOUSE 40S ribosomal protein S21 OS=Mus musculus GN-Rps21 PE-2 SV=1	1.243	0.1721	0.6384	0.7577	0.1082	0.96	0.92	0.71	0.70	0.94	
»g D3Z71 D3Z71_MOUSE 40S ribosomal protein S14 (Fragment) OS=Mus musculus GN-Rps14 PE-3 SV=1	0.6853	-0.174	-0.112	-0.3488	0.0738	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	
»r Q3J55 Q3J55_MOUSE Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN-Rps14 PE-2 SV=1	0.1756	0.8759	0.535	0.7389	0.1967	1.00	0.87	0.96	0.93	1.00	
»r D3Z72 D3Z72_MOUSE 40S ribosomal protein S19 OS=Mus musculus GN-Rps19 PE-4 SV=1	1.178	0.9713	0.9866	0.7444	0.9559	0.96	0.70	0.68	0.83	0.71	
»g P62444 RS2_MOUSE 40S ribosomal protein S25 OS=Mus musculus GN-Rps25 PE-1 SV=3	2.2102	1.9531	1.3891	0.2126	0.8804	0.72	0.05	0.14	0.39	0.51	
»g Q8CQD2 Q8CQD2_MOUSE Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN-Rps25 PE-2 SV=1	1.9693	0.934	0.2999	0.0288	0.959	0.81	0.03	0.04	0.57	0.17	
»g Q8VHB1 RS3_MOUSE 60S ribosomal protein L38 OS=Mus musculus GN-Rpl38 PE-2 SV=3	1.5966	-1.151	-1.823	-0.0732	-2.346	0.34	0.09	0.16	0.06	0.75	
»g P99027 RLA2_MOUSE 60S acidic ribosomal protein P2 OS=Mus musculus GN-Rplp2 PE-1 SV=3	-0.996	-1.676	-1.811	-2.5659	-2.305	0.88	0.18	0.14	0.65	0.47	
»g P19253 RL13A_MOUSE 60S ribosomal protein L13a OS=Mus musculus GN-Rpl13a PE-1 SV=4	-1.251	-1.038	-2.698	-1.2018	-1.613	0.63	0.78	0.93	0.54	0.25	
»g P62903 RL1_MOUSE 60S ribosomal protein L1 OS=Mus musculus GN-Rpl1 PE-1 SV=1	-0.777	-2.896	-1.898	-1.8299	-2.472	0.91	0.65	0.51	0.53	0.72	
»g P62841 RL2_MOUSE 60S ribosomal protein L40 OS=Mus musculus GN-Rpl40 PE-2 SV=1	0.4338	-2.068	-1.962	-2.4577	-1.638	0.99	0.91	0.91	0.91	0.91	
»g P14148 RL7_MOUSE 60S ribosomal protein L7 OS=Mus musculus GN-Rpl7 PE-2 SV=2	-0.587	-2.08	-2.54	-2.1288	-2.35	0.88	1.00	0.98	0.99	0.94	
»g P35979 RL12_MOUSE 60S ribosomal protein L12 OS=Mus musculus GN-Rpl12 PE-1 SV=2	0.4756	-1.807	-2.385	-1.9251	-2.465	1.00	1.00	0.96	0.98	0.78	
»g Q8CQW7 RL24_MOUSE 60S ribosomal protein L24 OS=Mus musculus GN-Rpl24 PE-1 SV=2	-0.124	-1.813	-2.028	-1.6416	-2.263	0.97	1.00	0.93	1.00	0.91	
»g Q8CQW7 RL1_MOUSE 60S ribosomal protein L10 OS=Mus musculus GN-Rpl10 PE-1 SV=3	-0.49	-2.068	-2.386	-2.0151	-1.638	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
»g Q8CQW7 RL3_MOUSE 60S ribosomal protein L36 OS=Mus musculus GN-Rpl36 PE-2 SV=1	2.0933	-2.325	-2.962	-1.5262	-1.238	0.85	0.92	0.70	1.00	1.00	
»g Q8CQW4 RL11_MOUSE 60S ribosomal protein L11 OS=Mus musculus GN-Rpl11 PE-1 SV=4	-0.429	-1.742	-2.049	-1.8288	-2.345	0.96	1.00	0.99	0.98	0.87	
»g Q8CQW2 RL15_MOUSE 60S ribosomal protein L15 OS=Mus musculus GN-Rpl15 PE-2 SV=4	0.7535	-2.438	-1.828	-1.8031	-1.467	1.00	0.95	1.00	0.99	1.00	
»g P47863 RL13_MOUSE 60S ribosomal protein L13 OS=Mus musculus GN-Rpl13 PE-1 SV=3	0.531	-2.032	-1.315	-1.3988	0.698	1.00	1.00	1.00	1.00	0.72	
»g P62984 RL2_MOUSE 60S ribosomal protein L12 OS=Mus musculus GN-Rpl12 PE-2 SV=2	0.3323	-1.839	-1.79	-1.5973	-2.071	1.01	1.00	1.00	1.01	0.91	
»g P47955 RLA1_MOUSE 60S acidic ribosomal protein P1 OS=Mus musculus GN-Rplp1 PE-1 SV=1	-0.528	-2.051	-1.008	-0.8352	-1.309	0.98	0.88	0.44	1.01	0.99	
»g P62171 RL18A_MOUSE 60S ribosomal protein L18a OS=Mus musculus GN-Rpl18a PE-1 SV=1	-0.022	-1.761	-1.122	-0.8938	-1.14	0.99	1.00	1.01	0.76	1.00	
»g P12070 RL1_MOUSE 60S ribosomal protein L2 OS=Mus musculus GN-Rpl2 PE-1 SV=1	-0.299	-1.598	-1.522	-1.0151	-1.341	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
»g Q8CPA4 RL17_MOUSE 60S ribosomal protein L17 OS=Mus musculus GN-Rpl17 PE-2 SV=3	0.6964	-1.426	-2.183	-1.7561	-0.601	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	
»g P62893 RL8_MOUSE 60S ribosomal protein L18 OS=Mus musculus GN-Rpl18 PE-2 SV=3	0.35	-2.146	-0.866	-0.9395	-1.587	1.00	0.97	1.01	1.00	1.00	
»g P62893 RL8_MOUSE 60S ribosomal protein L18 OS=Mus musculus GN-Rpl18 PE-2 SV=2	0.2757	-1.638	-1.4								

Like-Sm ribonucleoprotein, eukaryotic and archaea-type, core (IPR006649)	sgp P27048 RSMB_MOUSE Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein 8 OS=Mus musculus GN=Snrbp PE=1 SV=1	0.4251	-2.762	1.826	-1.7073	-2.117	1.01	0.97	1.00	1.00
	sgp Q35900 LSM2_MOUSE U6 snRNA-associated Sm-like protein Lsm2 OS=Mus musculus GN=Lsm2 PE=2 SV=1	-1.271	-1.585	2.296	2.2934	-1.859	0.92	1.00	0.90	0.91
	sgp P62305 RLKE_MOUSE Small nuclear ribonucleoprotein E OS=Mus musculus GN=Snrpe PE=2 SV=1	-0.142	-2.277	1.172	-1.231	-1.454	1.00	0.98	1.01	1.00
	sgp Q35910 SMO2_MOUSE Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS=Mus musculus GN=Snrpd2 PE=2 SV=1	0.5743	-1.571	1.8238	1.9788	-0.154	1.00	1.00	0.98	0.99
	sgp P62309 RLUG_MOUSE Small nuclear ribonucleoprotein L OS=Mus musculus GN=Snrpl PE=2 SV=2	-0.36	-1.316	-1.363	-1.4031	-1.383	1.01	1.00	1.00	1.01
	sgp P62320 SMO3_MOUSE Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Mus musculus GN=Snrpd3 PE=1 SV=1	0.0897	-0.866	-1.372	-1.7027	-1.416	1.00	1.00	1.01	1.00
	sgp Q8VCR5 LSM1_MOUSE U6 snRNA-associated Sm-like protein Lsm1 OS=Mus musculus GN=Lsm1 PE=2 SV=1	-0.098	-1.118	-1.288	-1.0074	-1.558	0.96	1.00	1.01	0.99
	sgp Q35915 LSM4_MOUSE U6 snRNA-associated Sm-like protein Lsm4 OS=Mus musculus GN=Lsm4 PE=2 SV=1	0.046	-0.857	-1.388	-1.0297	-1.552	1.00	1.00	1.01	1.00
	sgp P62322 LSM6_MOUSE U6 snRNA-associated Sm-like protein Lsm6 OS=Mus musculus GN=Lsm6 PE=2 SV=2	-0.435	-1.08	-1.059	-0.659	-1.003	1.01	1.00	1.01	1.00
	sgp Q62WM4 NAA38_MOUSE N-alpha-acetyltransferase 38, Nac Auxiliary subunit OS=Mus musculus GN=Naa38 PE=2 SV=3	-0.545	-0.148	-0.514	-0.8351	-1.137	1.00	0.95	1.00	1.01
ARF/SAR superfamily (IPR006689)	sgp P62313 LSM6_MOUSE U6 snRNA-associated Sm-like protein Lsm6 OS=Mus musculus GN=Lsm6 PE=2 SV=1	0.1876	-0.902	-0.763	-0.622	-0.111	1.00	1.00	1.00	1.00
	sgp P62315 SMO1_MOUSE Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Mus musculus GN=Snrpd1 PE=2 SV=1	-0.156	-1.554	1.528	1.7665	-1.24	1.00	0.99	1.01	1.00
	sgp P62311 LSM5_MOUSE U6 snRNA-associated Sm-like protein Lsm5 OS=Mus musculus GN=Lsm5 PE=2 SV=2	-0.053	-0.346	-0.267	-0.2148	-0.15	1.00	1.00	1.00	1.00
	sgp Q8QCB8 LSM7_MOUSE U6 snRNA-associated Sm-like protein Lsm7 OS=Mus musculus GN=Lsm7 PE=2 SV=1	-0.16	-1.274	1.1246	0.7586	0.9655	1.00	1.00	0.90	0.91
	sgp P84078 ARF1_MOUSE ADP-ribosylation factor 1 OS=Mus musculus GN=Arf1 PE=1 SV=2	-2.233	-2.391	2.368	3.6731	-2.668	0.97	0.99	1.01	0.97
	sgp P36363 SAR1A_MOUSE GTP-binding protein SAR1A OS=Mus musculus GN=Sar1a PE=2 SV=1	-2.464	-2.479	2.796	2.0378	-1.945	0.86	0.91	0.94	0.96
	sgp P84084 ARF5_MOUSE ADP-ribosylation factor 5 OS=Mus musculus GN=Arf5 PE=2 SV=2	-1.38	-2.017	2.442	2.925	-1.021	0.99	0.94	0.92	0.83
	sgp P61750 ARF4_MOUSE ADP-ribosylation factor 4 OS=Mus musculus GN=Arf4 PE=2 SV=2	-1.52	-1.348	-2	-2.826	-1.501	1.00	1.00	1.01	1.00
	sgp Q9UWU7 ARL3_MOUSE ADP-ribosylation factor-like protein 3 OS=Mus musculus GN=Arf3 PE=1 SV=1	-0.873	-1.773	1.499	-1.6295	-2.281	1.00	0.99	1.00	0.85
	sgp Q9D0U4 AR2_MOUSE ADP-ribosylation factor-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Arf2 PE=1 SV=1	-0.528	-1.554	1.529	-1.7665	-1.24	1.00	0.99	1.01	1.00
Cyclophilins, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase domain containing proteins (PTHR11071)	sgp Q8BL57 ARF2_MOUSE ADP-ribosylation factor 2 OS=Mus musculus GN=Arf2 PE=1 SV=2	-1.355	-0.672	-1.165	-1.8695	-1.242	0.94	1.00	0.94	0.91
	tr Q9BUZ4 Q9BUZ4_MOUSE GTP-binding protein SAR1A OS=Mus musculus GN=Sar1a PE=2 SV=1	-1.655	-1.86	-1.863	-0.955	-0.279	0.95	0.97	1.00	1.01
	sgp P62331 ARF6_MOUSE ADP-ribosylation factor 6 OS=Mus musculus GN=Arf6 PE=1 SV=2	-0.22	-0.697	-1.015	-1.9002	-0.747	1.00	1.00	1.01	1.00
	sgp Q8B865 ARL5_MOUSE ADP-ribosylation factor-like protein 15 OS=Mus musculus GN=Arf15 PE=2 SV=1	0.8071	-0.854	-0.859	-1.1834	-0.984	0.99	1.00	1.01	1.00
	sgp P62311 ARL3_MOUSE ADP-ribosylation factor-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Arf3 PE=2 SV=1	-0.173	-0.675	-0.725	-1.5207	-0.652	0.99	1.00	0.98	1.00
	sgp Q8CQC5 SAR1B_MOUSE GTP-binding protein SAR1B OS=Mus musculus GN=Sar1B PE=1 SV=1	-0.193	-0.483	-0.571	-1.2651	-0.2	1.00	1.00	0.98	1.00
	tr Q9D0U4 Q9D0U4_MOUSE Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN=Arf4 PE=2 SV=1	-0.091	-0.229	-0.502	-0.4555	-0.899	1.01	1.00	1.01	1.00
	sgp Q8CWN2 ARL8_MOUSE ADP-ribosylation factor-like protein 8 OS=Mus musculus GN=Arf8 PE=2 SV=1	0.3552	-0.203	-0.688	-0.2365	-0.231	0.92	1.00	0.96	0.99
	sgp Q8VCR5 ARL8_MOUSE ADP-ribosylation factor-like protein 8A OS=Mus musculus GN=Arf8A PE=2 SV=1	0.0087	0.6838	0.577	0.3166	-2.433	0.88	0.94	0.99	0.79
	sgp Q8B848 ARL6_MOUSE ADP-ribosylation factor-like protein 6 OS=Mus musculus GN=Arf6 PE=2 SV=1	0.2616	0.3174	-0.311	0.60962	0.7837	1.00	0.95	1.00	0.66
Cytoskeletal regulation by Rho GTPase (P00016)	sgp P17142 PP4_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Mus musculus GN=Ppi4 PE=1 SV=2	-0.609	-1.536	1.449	0.7299	1.154	0.99	0.54	0.55	0.58
	sgp Q8C868 PP4L_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F OS=Mus musculus GN=Ppi4L PE=1 SV=1	-0.146	-2.496	2.977	2.227	-0.749	0.24	0.47	0.65	0.45
	sgp P30412 PP1C_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C OS=Mus musculus GN=PpiC PE=1 SV=1	0.2238	-2.246	-2.093	-2.2473	-2.583	1.00	0.98	1.00	0.85
	sgp P24369 PP1B_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Mus musculus GN=PpiB PE=2 SV=2	-1.631	-1.341	-1.658	-2.4266	-1.485	0.88	1.00	1.00	1.00
	sgp P34515 NCTR_MOUSE NK tumor recognition protein OS=Mus musculus GN=Ntrr PE=1 SV=3	-0.411	-1.237	-1.307	-0.7573	-1.692	1.00	1.01	1.01	0.98
	sgp Q8CQK3 PP1E_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E OS=Mus musculus GN=PpiE PE=2 SV=2	-0.546	-0.913	-1.644	-0.1014	-0.129	1.00	1.00	1.01	1.00
	sgp AZA802 PP1G_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G OS=Mus musculus GN=PpiG PE=1 SV=1	-0.429	-0.617	-0.168	-0.4811	-0.346	1.00	1.00	1.00	1.00
	sgp Q8CQK3 PP1L_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4 OS=Mus musculus GN=PpiL PE=2 SV=2	-0.347	-0.401	-0.08	-0.1348	-0.03	1.01	1.00	0.99	1.00
	sgp Q8DLU8 PP1L3_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 3 OS=Mus musculus GN=PpiL3 PE=2 SV=1	0.0898	0.5736	-0.165	-0.5745	0.0555	0.97	0.89	1.01	1.01
	sgp Q8CQK5 PP1L2_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1 OS=Mus musculus GN=PpiL2 PE=2 SV=1	0.0098	0.6955	0.3831	0.5003	0.3451	0.99	1.00	0.99	0.95
Antioxidant (KW-0315)	sgp Q8C816 PP1D_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D OS=Mus musculus GN=PpiD PE=1 SV=3	0.2778	0.5682	0.8688	0.21569	0.5674	1.00	0.50	0.39	0.59
	sgp Q3TKK6 CWC2_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CWC2 homolog OS=Mus musculus GN=Cwc2 PE=1 SV=1	0.9697	1.2784	1.1768	1.0029	1.2362	0.97	0.53	0.64	0.63
	sgp P62962 PROF1_MOUSE Profilin-1 OS=Mus musculus GN=Prof1 PE=1 SV=2	-2.419	-2.859	-3.166	-3.268	-3.221	0.76	0.22	0.17	0.33
	sgp Q8C876 ARPC2_MOUSE Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Mus musculus GN=Arpc2 PE=1 SV=3	-1.417	-1.865	2.311	1.5564	-0.774	0.92	0.69	0.94	0.13
	sgp Q8C566 MYH6_MOUSE Myosin-6 OS=Mus musculus GN=Myh6 PE=1 SV=2	-1.546	-2.316	1.314	1.2551	2.388	0.76	0.16	0.07	0.15
	sgp Q8C9W4 ARPC5_MOUSE Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 OS=Mus musculus GN=Arpc5 PE=2 SV=3	-0.183	-2.416	-2.79	-2.5826	-3.138	0.40	0.34	0.30	0.57
	sgp P18780 COF1_MOUSE Cofilin-1 OS=Mus musculus GN=Cfl1 PE=1 SV=3	-0.301	-2.398	-2.347	-2.6619	-2.456	1.00	0.50	0.64	0.69
	sgp Q8C9W2 ARPC1_MOUSE Actin-related protein 2/3 complex subunit 1 OS=Mus musculus GN=Arpc1b PE=1 SV=4	-0.085	-3.238	1.803	1.3497	-3.026	1.00	0.47	0.40	0.55
	sgp P59995 ARPC4_MOUSE Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Mus musculus GN=Arpc4 PE=1 SV=3	-0.536	-1.686	-2.115	-1.9889	-2.063	1.01	0.84	0.73	0.52
	sgp Q7TMM6 TBB2A_MOUSE Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus GN=Tubb2a PE=1 SV=1	-2.173	-1.934	-1.42	2.6231	-1.972	0.78	0.78	0.98	0.78
Glutamine amidotransferase (KW-0315)	sgp P60766 TBB4_MOUSE Cell division control protein 42 homolog OS=Mus musculus GN=Cdc42 PE=1 SV=2	-0.858	-1.612	-1.639	-2.0032	-1.925	1.00	0.87	0.91	0.85
	sgp P99024 TBB5_MOUSE Tubulin beta-5 chain OS=Mus musculus GN=Tubb5 PE=1 SV=1	-0.888	-1.689	-1.421	2.3607	-1.109	0.24	0.47	0.65	0.45
	sgp Q8LUQ0 RHOA_MOUSE Transforming protein RhoA OS=Mus musculus GN=Rhoa PE=1 SV=1	-0.653	-1.362	-1.472	-1.8005	-1.588	1.01	0.96	0.96	0.97
	sgp P45595 COF2_MOUSE Cofilin-2 OS=Mus musculus GN=Cfl2 PE=1 SV=1	-0.149	-0.95	-1.964	-1.9679	-1.507	1.00	1.00	0.79	0.92
	sgp Q8B868 ARPC5_MOUSE Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein OS=Mus musculus GN=Arpc5l PE=1 SV=1	0.1443	-1.803	-1.306	-1.3277	-1.897	1.01	0.73	0.96	0.77
	sgp P30031 PAC1_MOUSE Protein phosphatase 1 OS=Mus musculus GN=Pac1 PE=1 SV=1	-0.8849	-0.82	-1.622	1.9667	-0.79	0.99	0.99	0.99	0.99
	sgp Q81263 MYH7_MOUSE Myosin-7 OS=Mus musculus GN=Myh7 PE=1 SV=1	-1.111	0.1295	2.333	2.2344	-1.056	1.00	0.50	0.44	0.57
	sgp Q8R0P5 DEST_MOUSE Destrin OS=Mus musculus GN=Dtn PE=1 SV=3	0.263	-0.379	-1.733	2.6265	-1.144	1.00	1.00	0.90	0.68
	tr Q8C8X3 Q8C8X3_MOUSE MKIAA866 protein (Fragment) OS=Mus musculus GN=Myh11 PE=2 SV=1	-0.395	-1.139	-0.893	-0.0252	-1.638	1.01	0.96	1.00	0.86
	sgp Q8A825 RHG3_MOUSE Rho GTPase-activating protein 31 OS=Mus musculus GN=Arhg3p1 PE=1 SV=1	0.0474	-1.23	-0.86	0.10294	-0.212	1.00	1.00	1.00	1.00
5HT3 type receptor mediated signaling pathway (P04375)	sgp P54227 STMN1_MOUSE Stathmin OS=Mus musculus GN=Stmn1 PE=1 SV=2	-0.659	-1.226	-1.547	-0.9302	-0.832	1.00	0.94	0.88	1.00
	sgp Q811P8 RHG32_MOUSE Rho GTPase-activating protein 32 OS=Mus musculus GN=Arhg32 PE=1 SV=2	-1.641	-0.931	-0.989	-1.168	-1.07	0.87	0.98	0.99	0.98
	sgp Q8R0D7 TBB1_MOUSE Tubulin beta-1 chain OS=Mus musculus GN=Tubb1 PE=1 SV=1	-1.505	-0.909	-0.659	-1.4752	-0.73	0.92	1.00	1.01	0.99
	sgp Q71975 SNA1_MOUSE Protein phosphatase 1 homolog OS=Mus musculus GN=Sna1 PE=1 SV=1	-0.634	-1.054	-0.804	-1.1231	-0.745	1.00	1.00	1.00	1.00
	sgp Q8CWF2 TBB2_MOUSE Tubulin beta-2B chain OS=Mus musculus GN=Tubb2b PE=1 SV=1	-1.364	-0.787	-0.588	-1.1647	-1.006	0.92	1.01	0.99	1.00
	sgp Q8CVB6 ARPC2_MOUSE Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Mus musculus GN=Arpc2 PE=1 SV=3	-0.386	-0.817	-0.555	-2.0781	0.0566	1.00	1.00	1.00	0.95
	sgp P60766 MYH6_MOUSE Unconventional myosin-XVI OS=Mus musculus GN=Myh6 PE=1 SV=2	0.1601	-0.49	0.3789	-0.0255	-0.813	1.00	1.00	0.79	1.01
	sgp Q8B7V5 PAK4_MOUSE Serine/threonine-protein kinase PAK 4 OS=Mus musculus GN=Pak4 PE=1 SV=1	-0.097	-0.298	-0.271	-0.9035	-0.468	1.00	0.99	1.00	1.00
	sgp Q8Q733 RHQI_MOUSE Rho-related GTP-binding protein RhoQ OS=Mus musculus GN=RhoQ PE=2 SV=1	-1.104	-0.391	-1.02	-0.7142	-0.243	0.96	1.00	0.99	1.01
	sgp Q8CQD5 MYH5_MOUSE Myosin-5 OS=Mus musculus GN=Myh5 PE=1 SV=1	-0.132	-0.171	-0.006	-1.1705	-1.253	1.00	1.01	1.01	1.00
Antioxidant (KW-0315)	sgp Q8B9H3 MYO3_MOUSE Myosin-IIIa OS=Mus musculus GN=Myo3a PE=2 SV=1	0.0243	-0.189	0.1031	0.12844	-1.243	1.00	1.00	0.99	1.00
	sgp Q8CQD5 MYH5_MOUSE Myosin-5 OS=Mus musculus GN=Myh5 PE=1 SV=1	0.3498	0.575	0.6797	0.3888	-0.739	1.00	1.00	1.00	1.00
	sgp Q7T566 DIAP2_MOUSE Protein diaphanous homolog 2 OS=Mus musculus GN=Diaph2 PE=1 SV=2	-0.977	-0.171	-0.56	-0.9181	-0.401	0.99	1.00	1.01	1.00
	sgp Q8R402 ARHG2_MOUSE Rho guanine nucleotide exchange factor 12 OS=Mus musculus GN=Arhgf2 PE=1 SV=2	-1.237	-0.438	-0.5	-0.5536	-0.466	1.00	0.95	1.01	1.00
	sgp Q82159 RHOC_MOUSE Rho-related GTP-binding protein RhoC OS=Mus musculus GN=Rhoc PE=1 SV=2	0.3207	-0.838	-0.256	-0.385	-0.677	1.01	1.00	1.00	1.00
	sgp Q8B7V5 PAK4_MOUSE Serine/threonine-protein kinase PAK 2 OS=Mus musculus GN=Pak2 PE=1 SV=1	-0.092	-0.262	-0.52	-0.4758	-0.933	1.00	1.00	1.00	1.00
	sgp Q8G703 PIK6G_MOUSE Pleckstrin homology domain-containing family G member 5 OS=Mus musculus GN=Plekha5 PE=1 SV=1	-1.818	-0.815	-0.592	0.13152	0.1082	0.80	0.99	1.01	1.01
	sgp Q8X403 MYH1_MOUSE Myosin-1 OS=Mus musculus GN=Myh1 PE=1 SV=1	-0.841	-1.291							

	»[Q00780] COB1_MOUSE Collagen alpha-1(VIII) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=1 SV=3	0.5086	-0.844	-1.178	0.3115	-2.056	1.00	0.63	0.59	0.01	0.27
	»[P41245] MMP9_MOUSE Matrix metalloproteinase-9 OS=Mus musculus GN=Mmp9 PE=2 SV=2	-2.046	1.111	-1.777	0.4563	-0.77	0.46	0.02	0.53	1.00	0.98
	»[Q80K2] P1D01_MOUSE Procollagen-lysine-2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 OS=Mus musculus GN=Plod1 PE=1 SV=1	0.9878	-0.845	-0.792	1.666	-1.036	0.002	0.29	0.58	0.18	0.35
	»[Q80992] C10F5_MOUSE C1q related factor OS=Mus musculus GN=C1qlf1 PE=1 SV=1	0.142	-0.589	-0.544	-0.4178	0.339	1.01	0.46	1.00	0.91	0.98
	»[Q80847] COC41_MOUSE Collagen alpha-1(XVII) chain OS=Mus musculus GN=Col1a2 PE=2 SV=3	1.1379	2.1391	0.971	0.3524	-2.361	1.00	1.00	0.35	0.01	0.03
	»[P39063] COA1_MOUSE Collagen alpha-1(XVIII) chain OS=Mus musculus GN=Col18a1 PE=1 SV=4	-0.446	-1.105	-1.008	-0.4775	-1.115	1.00	0.80	0.88	1.00	0.87
	»[Q80X19] COE41_MOUSE Collagen alpha-1(XIV) chain OS=Mus musculus GN=Col14a1 PE=2 SV=2	-0.766	-0.268	-0.621	-0.9616	-1.218	0.88	0.83	0.80	0.67	0.70
	»[Q84739] COB2_MOUSE Collagen alpha-2(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a2 PE=2 SV=3	0.2194	0.435	0.1247	1.6486	-1.484	1.00	1.00	1.01	0.49	0.67
	»[P50844] SFPD_MOUSE Myosin surface-associated protein D OS=Mus musculus GN=Sfpd PE=2 SV=1	-0.181	1.113	0.161	-0.348	-0.768	1.01	0.79	1.01	1.00	0.98
	»[Q61388] POC1_MOUSE Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 OS=Mus musculus GN=Poc1e PE=1 SV=2	-0.631	-0.071	-0.541	-0.6472	-1.046	0.89	0.86	0.80	0.81	0.75
	»[A2AX52] COG4_MOUSE Collagen alpha-4(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col4a4 PE=1 SV=2	0.1454	-0.262	-1.026	-0.1788	-0.541	1.01	0.97	1.00	1.00	0.99
	»[Q2QD29] CORA_MOUSE Collagen alpha-1(XXXIV) chain OS=Mus musculus GN=Col27a1 PE=2 SV=1	-0.1525	0.117	-0.412	0.8837	-0.341	0.99	1.00	0.99	0.93	1.00
	»[Q07643] COG2_MOUSE Collagen alpha-2(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col2a1 PE=2 SV=1	1.4266	0.5586	-0.418	-0.3956	0.894	0.93	1.00	0.99	1.00	0.95
	»[Q8BL07] COG41_MOUSE Collagen alpha-1(XVII) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=2 SV=2	-0.357	0.6854	0.442	-0.5575	1.487	0.96	1.00	1.01	0.91	0.99
	»[Q99M03] COP1_MOUSE Collagen alpha-1(XXXV) chain OS=Mus musculus GN=Col25a1 PE=2 SV=1	-0.174	-0.573	-0.048	0.03816	-0.221	1.00	0.97	1.01	1.01	1.00
	»[Q2U1V1] COSA1_MOUSE Collagen alpha-1(XXXVII) chain OS=Mus musculus GN=Col28a1 PE=2 SV=1	-0.81	0.2588	0.0172	1.64862	-1.381	0.93	1.00	1.00	0.92	1.00
	»[Q02964] ADPO_MOUSE Adiponectin OS=Mus musculus GN=Adipoq PE=1 SV=1	0.7112	0.028	0.273	0.11543	0.3887	1.01	1.00	1.01	1.01	0.83
	»[Q8C609] COG6_MOUSE Collagen alpha-6(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col6a6 PE=1 SV=2	0.451	0.5064	0.209	-0.0602	-0.363	1.00	1.00	1.01	1.00	1.00
	»[Q02788] COG2_MOUSE Collagen alpha-2(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col2a2 PE=2 SV=3	-0.86	0.0332	0.5561	0.1485	-0.284	0.87	0.96	1.01	1.00	1.00
	»[Q8K472] EML1_MOUSE EMLIN 1 OS=Mus musculus GN=Emlin1 PE=1 SV=1	-0.158	0.1555	-0.6673	0.25701	-0.303	0.92	0.97	1.01	1.00	1.00
	»[Q53306] COA41_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=2 SV=1	0.8072	1.8984	0.1466	-0.1186	-0.391	1.00	0.99	1.01	1.00	1.00
	»[Q53206] COF1_MOUSE Collagen alpha-1(XV) chain OS=Mus musculus GN=Col15a1 PE=1 SV=2	-0.068	0.105	0.646	0.30691	0.269	1.00	0.99	1.00	1.01	1.00
	»[Q05722] COR1_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=2 SV=2	0.141	0.3189	0.866	-0.2141	0.4606	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	»[Q40857] COS1_MOUSE Collagen alpha-1(XV) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=2 SV=1	0.0033	1.1558	0.6888	0.4168	0.642	0.99	1.00	1.01	1.01	0.90
	»[Q10077] COO41_MOUSE Collagen alpha-1(XXXVI) chain OS=Mus musculus GN=Col26a1 PE=2 SV=2	0.7056	0.7566	0.1341	0.62001	-0.656	1.00	1.00	1.01	1.01	0.90
	»[Q05661] OSU2_MOUSE Collagen type I alpha 3 chain OS=Mus musculus GN=Col3a3 PE=2 SV=1	0.5661	0.9281	0.254	-0.2223	0.8179	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00
	»[Q00716] P4H4_MOUSE Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2 OS=Mus musculus GN=P4h4 PE=2 SV=1	1.8545	0.8919	0.5487	0.1606	0.5309	1.00	0.99	0.99	1.00	1.00
	»[Q02979] COC4_MOUSE Collagen alpha-4(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col4a4 PE=1 SV=1	0.5768	0.59	0.8607	0.9273	-1.121	1.00	1.00	1.00	1.00	0.74
	»[P39030] MBL1_MOUSE Membrane-binding protein A OS=Mus musculus GN=MBL1 PE=2 SV=1	0.1566	-0.179	-0.222	1.19541	1.2471	1.01	1.00	1.01	1.01	0.81
	»[Q00Q77] C1Q1_MOUSE Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1 OS=Mus musculus GN=C1qtf1 PE=2 SV=1	0.0892	1.0354	1.0874	0.4561	0.0543	1.00	1.00	0.99	1.01	1.00
	»[Q8K072] COH1_MOUSE Collagen alpha-1(XVII) chain OS=Mus musculus GN=Col17a1 PE=1 SV=3	0.9403	-0.511	1.5795	0.76487	0.918	1.00	0.91	0.95	1.01	1.00
	»[Q80827] COS1_MOUSE Collagen alpha-1(XV) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=2 SV=2	1.4972	1.4460	0.614	0.51515	0.6221	1.00	1.00	1.01	1.00	1.00
	»[Q02463] COA41_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=2 SV=4	-1.049	0.023	0.4386	1.2104	1.6476	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	»[Q023P0] COA1_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col2a1 PE=2 SV=3	1.3607	1.0553	1.2769	-0.3607	1.3592	0.97	1.00	0.99	1.00	0.91
	»[Q8K736] CO71_MOUSE Collagen alpha-1(XVII) chain OS=Mus musculus GN=Col7a1 PE=2 SV=3	0.2858	0.07	0.7289	0.10311	1.286	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97
	»[Q8K428] COL12_MOUSE Collagen-12 OS=Mus musculus GN=Col12a1 PE=1 SV=1	0.416	1.2465	1.269	1.15343	0.21	0.97	1.00	1.00	1.00	0.99
	»[Q8K478] C1Q2_MOUSE Complement C1q tumor necrosis factor-related protein OS=Mus musculus GN=C1qtf1 PE=2 SV=1	1.038	0.2011	1.2577	1.17731	1.7352	1.00	1.00	1.00	1.00	0.79
	»[P25318] COB2_MOUSE Collagen alpha-2(VIII) chain OS=Mus musculus GN=Col2a2 PE=2 SV=2	0.7287	1.1868	0.9871	1.02394	1.179	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97
	»[Q8K482] EML2_MOUSE EMLIN 2 OS=Mus musculus GN=Emlin2 PE=1 SV=1	0.671	1.2589	1.0025	0.67928	0.2881	1.01	0.49	1.01	1.01	1.00
	»[Q02928] COA41_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=2 SV=2	1.1996	1.454	1.6288	0.90307	0.9395	0.98	0.97	1.00	1.00	1.00
	»[Q80196] COA1_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=2 SV=1	0.8812	1.1568	1.4051	1.19732	0.9353	1.01	0.98	0.98	0.99	1.00
	»[Q61245] COB1_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=1 SV=2	1.0258	1.1628	1.4298	1.58186	0.9787	1.00	1.00	1.01	0.99	1.00
	»[Q80122] COA2_MOUSE Collagen alpha-2(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col2a2 PE=2 SV=4	0.7844	1.1978	1.582	1.43765	1.7136	1.00	1.00	0.97	0.97	0.81
	»[Q80822] COA2_MOUSE Collagen alpha-2(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col2a2 PE=2 SV=1	1.6828	2.064	1.3022	1.30209	1.6557	0.87	1.00	1.01	1.01	0.94
	»[A0H584] COG45_MOUSE Collagen alpha-5(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col5a1 PE=1 SV=3	0.9058	1.1131	1.0829	0.85119	1.4024	1.01	0.91	1.01	1.01	0.89
	»[Q00754] MARCO_MOUSE Macrophage receptor MARCO OS=Mus musculus GN=Marco PE=1 SV=1	1.1585	2.0679	1.8347	1.97455	1.0188	1.00	0.89	0.94	0.84	1.00
	»[Q01149] CO1A2_MOUSE Collagen alpha-2(I) chain OS=Mus musculus GN=Col1a2 PE=2 SV=2	1.7636	2.2493	1.7105	1.2708	1.6168	0.91	1.00	1.01	0.67	0.98
	»[Q00V58] COA1_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=2 SV=2	-2.17	-1.526	1.951	1.0291	1.4624	0.37	0.58	0.01	0.01	0.01
	»[Q02W51] COE2_MOUSE Collagen alpha-2(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col2a2 PE=1 SV=1	0.4218	1.5797	1.446	1.7654	1.2104	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	»[P23845] COA1_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=1 SV=2	1.6079	2.6217	1.2259	2.9781	2.6031	0.46	0.77	0.38	0.42	0.46
	»[P11087] COA1_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=1 SV=4	2.128	1.1796	2.388	0.40745	2.156	0.84	0.86	0.92	0.16	0.85
	»[Q80121] COA1_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=2 SV=1	1.1041	1.1196	1.5099	1.80838	1.6881	1.01	0.84	0.92	0.18	0.94
	»[Q80280] SCAR3_MOUSE Scavenger receptor class B member 3 OS=Mus musculus GN=Scarb3 PE=2 SV=1	1.4965	1.9787	1.446	0.9154	1.2543	0.61	0.60	0.57	0.56	0.51
	»[Q8K402] CONA1_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col23a1 PE=2 SV=2	1.5546	1.5174	1.2103	1.57956	1.281	0.02	0.702	0.30	0.13	0.10
	»[Q8R022] TPM1_MOUSE Tropomyosin alpha-4 chain OS=Mus musculus GN=Tpma4 PE=2 SV=3	-1.269	1.172	4.864	-0.8734	-0.606	0.92	0.04	0.10	0.70	0.08
	»[P58771] TPM1_MOUSE Tropomyosin alpha-1 chain OS=Mus musculus GN=Tpma1 PE=1 SV=1	1.3465	2.912	3.047	-0.0218	-0.477	0.91	1.00	0.98	1.00	0.10
	»[Q17HE2] ML23_MOUSE Myosin regulatory light chain 12B OS=Mus musculus GN=My12b PE=1 SV=2	-0.009	-0.468	-1.186	-1.1027	1.18	1.00	0.22	0.43	0.92	0.71
	»[Q00602] MYL6_MOUSE Myosin light polypeptide 6 OS=Mus musculus GN=My16 PE=1 SV=3	-0.26	-0.311	-0.057	-0.057	-0.057	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	»[P17804] TAGL_MOUSE Taglin OS=Mus musculus GN=Tagln PE=1 SV=3	0.6249	-1.708	-2.679	-0.2813	-0.463	1.00	1.00	0.99	0.73	0.44
	»[Q00556] MYH6_MOUSE Myosin 6 OS=Mus musculus GN=Myh6 PE=1 SV=2	-1.946	1.918	1.334	-1.2591	-1.486	0.69	0.52	0.33	0.57	0.74
	»[P13003] DESM_MOUSE Desmin OS=Mus musculus GN=Des PE=1 SV=3	-2.148	-1.535	1.894	1.3434	1.478	0.30	1.00	0.89	0.97	1.00
	»[P58774] TPM2_MOUSE Tropomyosin beta chain OS=Mus musculus GN=Tpmb PE=1 SV=1	2.1514	-0.59	1.201	1.784	1.801	0.51	1.00	1.00	1.00	0.78
	»[P121077] TPM3_MOUSE Tropomyosin alpha-3 chain OS=Mus musculus GN=Tpma3 PE=1 SV=2	0.7941	-1.903	-2.047	-2.968	-1.114	1.00	0.99	1.01	1.01	1.00
	»[P62373] ACTA_MOUSE Actin, arctic smooth muscle OS=Mus musculus GN=Acta2 PE=1 SV=1	-0.184	-1.637	-1.313	1.1378	-2.131	1.00	0.99	0.98	1.01	0.84
	»[P72N13] B2BN3_MOUSE Myosin Tpm1 protein OS=Mus musculus GN=Tpma1 PE=2 SV=1	0.194	-0.45	-1.699	1.6208	1.194	1.00	1.00	1.00	1.00	0.78
	»[Q53283] MYH7_MOUSE Myosin 7 OS=Mus musculus GN=Myh7 PE=1 SV=1	-1.111	0.1259	0.285	-2.244	0.51	0.96	0.74	0.89	1.00	1.00
	»[Q8C143] MYL6B_MOUSE Myosin light chain 6B OS=Mus musculus GN=Myh6b PE=2 SV=1	1.0873	-1.791	-1.381	-1.7008	-1.136	0.94	1.00	1.01	1.00	1.00
	»[Q80K23] Q80K23_MOUSE MKIA0866 protein (Fragment) OS=Mus musculus GN=Myh11 PE=2 SV=1	-0.395	-1.119	-0.894	-1.7524	-1.638	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00
	»[P18026] KPE1_MOUSE Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform OS=Mus musculus GN=Phka1 PE=1 SV=3	1.6167	1.627	1.446	0.3994	1.442	0.85	1.00	1.00	1.00	1.00
	»[Q00C25] MYL3_MOUSE Myosin regulatory light polypeptide 3 OS=Mus musculus GN=Myh3 PE=1 SV=3	1.0297	-0.807	-0.427	0.4981	-0.642	0.95	1.00	1.01	1.00	1.00
	»[Q00V41] MLRA_MOUSE Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform OS=Mus musculus GN=Myh7 PE=2 SV=1	0.1882	-1.28	0.3971	-0.1865	-0.845	1.0				

Tabla Suplementaria 2. Reclasificación Funcional de las proteínas de las categorías "Collagen" y "Muscle Proteins"

Categoría Funcional ¹	Descripción del Fasta de la Proteína	Z_{qa}^2				
		2h	4h	6h	8h	10h
Fibrillar collagen	>sp Q64739 COBA2_MOUSE Collagen alpha-2(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col11a2 PE=2 SV=3	0.22	0.44	0.12	-1.64	-1.48
	>sp O88207 COSA1_MOUSE Collagen alpha-1(V) chain OS=Mus musculus GN=Col5a1 PE=2 SV=2	1.41	1.44	0.64	0.52	0.62
	>sp Q61245 COBA1_MOUSE Collagen alpha-1(XI) chain OS=Mus musculus GN=Col11a1 PE=1 SV=2	1.03	1.16	1.43	1.58	0.98
	>sp Q3U962 COSA2_MOUSE Collagen alpha-2(V) chain OS=Mus musculus GN=Col5a2 PE=1 SV=1	2.52	2.00	1.36	1.30	1.66
	>sp Q01149 CO1A2_MOUSE Collagen alpha-2(I) chain OS=Mus musculus GN=Col1a2 PE=2 SV=2	2.76	2.24	1.71	2.87	1.62
	>sp P08121 CO3A1_MOUSE Collagen alpha-1(III) chain OS=Mus musculus GN=Col3a1 PE=2 SV=4	1.10	3.13	2.51	3.90	3.08
	>sp P28481 CO2A1_MOUSE Collagen alpha-1(II) chain OS=Mus musculus GN=Col2a1 PE=1 SV=2	3.04	2.65	3.23	2.97	2.60
	>sp P11087 CO1A1_MOUSE Collagen alpha-1(I) chain OS=Mus musculus GN=Col1a1 PE=1 SV=4	3.22	3.18	2.39	4.05	2.16
	>sp P02463 CO4A1_MOUSE Collagen alpha-1(IV) chain OS=Mus musculus GN=Col4a1 PE=2 SV=4	-1.05	0.02	0.44	1.21	1.65
Basal Laminae collagen	>sp Q9QZ50 CO4A3_MOUSE Collagen alpha-3(V) chain OS=Mus musculus GN=Col4a3 PE=1 SV=2	1.20	1.45	1.63	0.90	0.94
	>sp P08122 CO4A2_MOUSE Collagen alpha-2(IV) chain OS=Mus musculus GN=Col4a2 PE=2 SV=4	0.78	1.20	1.58	1.44	1.71
	>tr Q63ZW6 Q63ZW6_MOUSE Col4a5 protein OS=Mus musculus GN=Col4a5 PE=2 SV=1	1.92	1.58	2.45	2.79	2.10
	>sp A2AX52 CO6A4_MOUSE Collagen alpha-4(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col6a4 PE=1 SV=2	0.15	-0.26	-1.03	-0.18	-0.54
Fibril-associated collagens	>sp Q02788 CO6A2_MOUSE Collagen alpha-2(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col6a2 PE=2 SV=3	-0.86	0.03	0.56	0.15	-0.28
	>sp Q8C6K9 CO6A6_MOUSE Collagen alpha-6(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col6a6 PE=1 SV=2	0.45	0.51	0.21	-0.06	-0.36
	>sp Q04857 CO6A1_MOUSE Collagen alpha-1(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col6a1 PE=2 SV=1	0.01	1.16	0.68	0.44	-0.64
	>sp Q0VF58 CO1A1_MOUSE Collagen alpha-1(XIX) chain OS=Mus musculus GN=Col19a1 PE=2 SV=2	-2.17	-1.53	1.95	4.03	4.06
	>sp A6H584 CO6A5_MOUSE Collagen alpha-5(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col6a5 PE=1 SV=2	0.91	3.14	1.08	0.85	1.49
Non-fibrillar collagen	>sp Q00780 CO8A1_MOUSE Collagen alpha-1(VIII) chain OS=Mus musculus GN=Col8a1 PE=1 SV=3	0.51	-0.84	-1.18	-3.32	-2.06
	>sp Q80X19 COEA1_MOUSE Collagen alpha-1(XIV) chain OS=Mus musculus GN=Col14a1 PE=2 SV=2	-0.77	-0.27	-0.62	-0.96	-1.22
	>sp Q60847 COCA1_MOUSE Collagen alpha-1(XII) chain OS=Mus musculus GN=Col12a1 PE=2 SV=3	1.14	2.19	-0.97	-2.68	-2.59
	>sp Q5QNQ9 CORA1_MOUSE Collagen alpha-1(XXVII) chain OS=Mus musculus GN=Col27a1 PE=2 SV=1	-0.52	0.11	-0.41	-0.84	-0.34
	>sp Q2UY11 COSA1_MOUSE Collagen alpha-1(XXVIII) chain OS=Mus musculus GN=Col28a1 PE=2 SV=1	-0.81	0.29	0.02	-0.65	-0.38
	>sp Q8BLX7 COGA1_MOUSE Collagen alpha-1(XVI) chain OS=Mus musculus GN=Col16a1 PE=2 SV=2	-0.36	0.69	0.44	-0.56	-1.50
	>sp Q35206 COFA1_MOUSE Collagen alpha-1(XV) chain OS=Mus musculus GN=Col15a1 PE=1 SV=2	-0.07	0.11	0.65	0.31	0.27
	>sp Q05306 COAA1_MOUSE Collagen alpha-1(X) chain OS=Mus musculus GN=Col10a1 PE=2 SV=1	0.95	1.20	0.55	-0.12	-0.39
	>sp Q07563 COHA1_MOUSE Collagen alpha-1(XVII) chain OS=Mus musculus GN=Col17a1 PE=1 SV=3	0.94	-0.51	1.58	0.76	0.92
	>sp Q63870 COT1_MOUSE Collagen alpha-1(VII) chain OS=Mus musculus GN=Col7a1 PE=2 SV=3	0.29	0.77	0.73	1.02	1.29
	>sp Q923P0 COKA1_MOUSE Collagen alpha-1(XX) chain OS=Mus musculus GN=Col20a1 PE=2 SV=3	1.26	1.10	1.27	-0.36	1.36
	>sp P25318 CO8A2_MOUSE Collagen alpha-2(VIII) chain OS=Mus musculus GN=Col8a2 PE=2 SV=2	0.73	1.19	0.99	1.02	1.18
	>sp Q9R1N9 CODA1_MOUSE Collagen alpha-1(XIII) chain OS=Mus musculus GN=Col13a1 PE=2 SV=1	0.88	1.52	1.49	1.20	0.94
	>sp P62737 ACTA_MOUSE Actin, aortic smooth muscle OS=Mus musculus GN=Acta2 PE=1 SV=1	-0.18	-1.64	-1.31	-3.14	-2.13
	>sp Q3THE2 ML12B_MOUSE Myosin regulatory light chain 12B OS=Mus musculus GN=Myl12b PE=1 SV=2	-0.07	-4.62	-4.19	-4.18	-1.28
VSMC thin filaments	>sp Q9WVA4 TAGL2_MOUSE Transgelin-2 OS=Mus musculus GN=Tagln2 PE=1 SV=4	-1.36	-4.03	-4.08	-4.56	-5.10
	>sp P37804 TAGL_MOUSE Transgelin OS=Mus musculus GN=Tagln PE=1 SV=3	0.62	-1.71	-2.68	-4.28	-4.86
	>sp Q9R1Q8 TAGL3_MOUSE Transgelin-3 OS=Mus musculus GN=Tagln3 PE=1 SV=1	-0.73	-0.90	-1.29	-1.65	-1.92
	>sp P62204 CALM_MOUSE Calmodulin OS=Mus musculus GN=Calml1 PE=1 SV=2	0.21	-4.97	-5.09	-3.93	-3.48

¹Categoría funcional reclasificadas según la literatura. ² Z_{qa} , log₂ ratio corregido y estandarizado a nivel de proteína, el color varía de -3 a 3 de verde a rojo.

Tabla Suplementaria 3. Proteínas de alta respuesta en VSMC reguladas por AngII

Función	Comentario	Descripción del Fasta de la Proteína	Z _{eq} ⁻¹					FDR _{eq} ⁻²					Máx. Ratio de Cambio	FDR ID mín. ⁴	
			Z _{eq} ⁻¹					FDR _{eq} ⁻²							
			2h	4h	6h	8h	10h	2h	4h	6h	8h	10h			
Proteólisis	regulates NF- κ B-target genes (Schweitzer et al. 2015)	>p Q3VDC5 UBP48_MOUSE Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48 OS=Mus musculus GN=Uup48 PE=1 SV=2	3.20	4.69	3.49	3.90	3.89	0.01	0.06	0.00	0.02	0.00	0.00	1.81	2
Organización del citoesqueleto	es sential for assembly of the dynein regulatory complex (Mervelle et al. 2011)	>p QDQ5Y1 CCD39_MOUSE Coiled-coil domain-containing protein 39 OS=Mus musculus GN=Ccdc39 PE=2 SV=1	4.10	3.41	3.45	3.36	3.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	1.74	2	
Factor de transcripción	regulates glucocorticoid-mediated gene induction (Kawabe et al. 2012)	>p QDIL60 GMEB1_MOUSE Glucocorticoid modulatory element-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Gmeb1 PE=2 SV=2	2.52	3.60	2.62	3.51	3.42	0.25	0.28	0.77	0.20	0.02	0.00	1.62	2
Transducción de señales	Calcium-dependent production of second messengers diacylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate (Popovics et al. 2011)	>p A2AP18 PLCH2_MOUSE 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-2 OS=Mus musculus GN=Plch2 PE=1 SV=2	3.29	4.05	3.08	2.21	2.11	0.23	0.05	0.00	0.56	0.42	0.47	1.79	2
Organización del citoesqueleto	promotes cell movement in human keratinocytes (Stehbens et al. 2014)	>r ASD6Q8 ASD6Q8_MOUSE "CLIP associating protein 1" OS=Mus musculus GN=Claap1 PE=2 SV=1	-0.95	-2.03	-2.66	-2.80	-4.00	0.98	0.98	0.31	0.18	0.15	0.00	1.78	2
Transducción de señales	regulates Rho-dependent signaling in cardiomyocytes (Seeger et al. 2010)	>p Q3UIJ9 MYZAP_MOUSE Myocardial zonula adherens protein OS=Mus musculus GN=Myzap PE=1 SV=1	0.93	4.32	3.97	0.30	-0.19	0.01	0.01	0.00	0.00	1.01	1.00	1.79	2
Factor de transcripción	inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis in cardiomyocytes (Li et al. 2013)	>p P40645 SOX6_MOUSE Transcription factor SOX-6 OS=Mus musculus GN=Sox6 PE=1 SV=2	-1.44	-2.08	-2.72	-1.87	-3.64	0.88	0.88	0.48	0.16	0.63	0.02	1.73	3
Factor de transcripción		>r Q3TFZ4 Q3TFZ4_MOUSE Protein Zfp7 OS=Mus musculus GN=Zfp7 PE=2 SV=1	-1.75	-1.92	-3.14	-2.26	-1.87	0.23	0.76	0.98	0.03	0.39	0.61	1.55	2
Desconocida		>r B2RW07 B2RW07_MOUSE Ataxin 7-like 1 OS=Mus musculus GN=Atxn7l1 PE=2 SV=1	-0.59	-2.24	-2.46	-1.96	-3.52	0.23	1.01	0.38	0.27	0.57	0.02	1.60	3
Deglucación de proteínas	protective against vascular damage progression (Skiba et al. 2014)	>p QER53 FNK3_MOUSE Fructosamine-3-kinase OS=Mus musculus GN=Fnk3 PE=2 SV=1	3.70	2.33	1.45	-1.63	-1.07	0.04	0.01	0.33	0.83	0.76	0.95	1.57	3
Desconocida		>p A2RT91 ANKAR_MOUSE Ankyrin and armadillo repeat-containing protein OS=Mus musculus GN=Ankar PE=2 SV=1	4.51	4.68	2.23	2.17	0.37	0.02	0.00	0.00	0.40	0.45	1.01	2.21	3
Metabolismo de ácidos grasos	medium-chain fatty acid:CoA ligase activity	>p QBDW40 ACSM4_MOUSE Acyl-coenzyme A synthetase ACSM4, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acsm4 PE=2 SV=1	3.30	3.50	1.46	-1.63	-1.40	0.86	0.05	0.80	0.83	0.76	0.83	1.63	2
Fusión de vesículas	calcium-dependent regulation of membrane structure (Marty et al. 2013)	>p QDESF1 OTOF_MOUSE Otofelin OS=Mus musculus GN=Otof PE=1 SV=1	0.03	0.03	0.41	1.09	1.75	0.92	0.00	0.08	1.01	0.95	0.68	1.82	2
Fusión de vesículas	Promotes membrane bending (Pang et al. 2014)	>p QBK2H4 ACAP1_MOUSE Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Acap1 PE=1 SV=1	3.33	3.02	1.29	2.88	1.76	2.46	0.04	0.08	0.89	0.13	0.67	1.51	3
Biosíntesis de lípidos	Involved in palmitic acid-induced VSMC calcification (Kageyama et al. 2013)	>p QDCZV4 ACSL3_MOUSE Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 3 OS=Mus musculus GN=Acsl3 PE=2 SV=2	2.60	2.68	1.73	3.19	2.11	2.68	0.01	0.17	0.70	0.06	0.47	1.51	3
Procesamiento de ARNm	mRNA splicing regulator (Navarro-Costa et al. 2010)	>p Q35698 HBY1A_MOUSE RNA-binding motif protein, Y chromosome, family 1 member A1 OS=Mus musculus GN=Rbmy1a1 PE=1 SV=2	1.99	2.10	2.49	3.09	3.31	2.72	0.62	0.47	0.25	0.01	0.04	1.73	2
Adhesión célula - célula	increases neural proliferation (Zhang et al. 2014)	>r QBKAC6 QBKAC6_MOUSE "Protocadherin 11 X-linked" OS=Mus musculus GN=Pcdh11x PE=2 SV=2	4.21	2.09	1.34	2.86	3.42	2.78	0.00	0.47	0.87	0.13	0.03	1.89	2
Desconocida		>r QBKX63 QBKX63_MOUSE RIKEN cDNA B930041F14 gene OS=Mus musculus GN=B930041F14RIK PE=2 SV=1	2.62	2.97	3.06	3.11	3.76	3.20	0.24	0.09	0.02	0.07	0.01	1.65	2
Adaptador	Regulates receptor tyrosine kinase signaling and endocytosis (Dilic 2002)	>p QBR550 SH3K1_MOUSE SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Sh3kbp1 PE=1 SV=1	4.10	3.38	2.95	3.31	2.91	3.31	0.90	0.03	0.10	0.04	0.12	1.84	2
Oncogén		>p QDV1N1 MFHA1_MOUSE Malignant fibrous histiocytoma-amplified sequence 1 homolog OS=Mus musculus GN=Mfhsat PE=2 SV=2	3.73	3.47	2.97	3.47	3.44	3.45	0.01	0.02	0.09	0.03	0.02	1.50	4
Andamiaje	tight-junction associated protein regulating cell polarity (Ebret et al. 2004)	>p QBRV66 MPDZ_MOUSE Multiple PDZ domain protein OS=Mus musculus GN=Mpdz PE=1 SV=2	4.94	3.13	3.43	3.07	3.54	3.74	0.00	0.06	0.03	0.01	0.02	2.19	2

¹Z_{eq}, log₂ ratio corregido y estandarizado a nivel de proteína, el color varía de -3 a 3 de verde a rojo. ²FDR_{eq}, tasa de valores que se desvían de la media cuantificación a nivel de proteína, se marcan en azul valores inferiores a 0,01. ³NOP, Número de péptidos con los que se ha identificado la proteína. ⁴FDR ID mín. tasa de falsos positivos de identificación mínima de los péptidos con los que se identificó la proteína.

Tabla Suplementaria 4. Listado completo de posibles interactores de RCAN1 en cerebro de ratón en condiciones basales

Descripción del Fasta de la Proteína	Z _{qa} ¹	FDR _{qa} ²
RCAN1_MOUSE Calciopressin-1 OS=Mus musculus GN=Rcan1 PE=1 SV=1	21.770	0.00
MYH8_MOUSE Myosin-8 OS=Mus musculus GN=Myh8 PE=1 SV=2	8.610	0.00
ACTN2_MOUSE Alpha-actinin-2 OS=Mus musculus GN=Actn2 PE=1 SV=1	7.605	0.00
MYH7_MOUSE Myosin-7 OS=Mus musculus GN=Myh7 PE=1 SV=1	7.390	0.00
GLRX1_MOUSE Glutaredoxin-1 OS=Mus musculus GN=Glrx PE=1 SV=3	7.378	0.00
QCR7_MOUSE Cytochrome b-c1 complex subunit 7 OS=Mus musculus GN=Uqcrb PE=1 SV=3	7.005	0.00
CF211_MOUSE UPF0364 protein C6orf211 homolog OS=Mus musculus PE=2 SV=1	7.003	0.00
MYH7B_MOUSE Myosin-7B OS=Mus musculus GN=Myh7b PE=3 SV=1	6.916	0.00
VDAC2_MOUSE Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Mus musculus GN=Vdac2 PE=1 SV=2	6.705	0.00
B1AR69_MOUSE Myosin heavy polypeptide 13 skeletal muscle OS=Mus musculus GN=Myh13 PE=4 SV=1	6.536	0.00
TNNC1_MOUSE Troponin C slow skeletal and cardiac muscles OS=Mus musculus GN=Tnncl PE=2 SV=1	6.237	0.00
DESM_MOUSE Desmin OS=Mus musculus GN=Des PE=1 SV=3	6.147	0.00
TPM2_MOUSE Tropomyosin beta chain OS=Mus musculus GN=Tpm2 PE=1 SV=1	5.797	0.00
F7CSZ6_MOUSE Protein Agl (Fragment) OS=Mus musculus GN=Agl PE=4 SV=1	5.712	0.00
GSK3B_MOUSE Glycogen synthase kinase-3 beta OS=Mus musculus GN=Gsk3b PE=1 SV=2	5.646	0.00
MLRV_MOUSE Myosin regulatory light chain 2 ventricular/cardiac muscle isoform OS=Mus musculus GN=Myl2 PE=1 SV=3	5.348	0.00
TPM1_MOUSE Tropomyosin alpha-1 chain OS=Mus musculus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	5.341	0.00
CYC2_MOUSE Cytochrome c testis-specific OS=Mus musculus GN=Cyct PE=1 SV=3	5.278	0.00
Q9D6F8_MOUSE Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN=Glrx PE=2 SV=1	5.216	0.00
D3YYZ2_MOUSE MCG1031578 OS=Mus musculus GN=Gm5239 PE=4 SV=1	5.158	0.00
Q9Z2L2_MOUSE Truncated hsp25 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Hsp25 PE=2 SV=1	4.862	0.00
LDB3_MOUSE Isoform 2 of LIM domain-binding protein 3 OS=Mus musculus GN=Ldb3	4.621	0.00
PPID_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D OS=Mus musculus GN=Ppid PE=1 SV=3	4.437	0.00
UBC9_MOUSE SUMO-conjugating enzyme UBC9 OS=Mus musculus GN=Ube2i PE=1 SV=1	4.219	0.00
AT5F1_MOUSE ATP synthase subunit b mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5f1 PE=1 SV=1	4.084	0.00
TANC2_MOUSE Protein TANC2 OS=Mus musculus GN=Tanc2 PE=1 SV=1	4.075	0.00
CANB1_MOUSE Calcineurin subunit B type 1 OS=Mus musculus GN=Ppp3r1 PE=1 SV=3	4.073	0.00
TXD12_MOUSE Thioredoxin domain-containing protein 12 OS=Mus musculus GN=Txndc12 PE=2 SV=1	4.048	0.00
PP2BA_MOUSE Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform OS=Mus musculus GN=Ppp3ca PE=1 SV=1	3.877	0.01
VIME_MOUSE Vimentin OS=Mus musculus GN=Vim PE=1 SV=3	3.832	0.01
B9EKT6_MOUSE IQ motif containing GTPase activating protein 3 OS=Mus musculus GN=Iqgap3 PE=2 SV=1	3.809	0.01
ATPA_MOUSE ATP synthase subunit alpha mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	3.803	0.01
SEPT4_MOUSE Septin-4 OS=Mus musculus GN=Sept4 PE=1 SV=1	3.787	0.01
GSK3A_MOUSE Glycogen synthase kinase-3 alpha OS=Mus musculus GN=Gsk3a PE=1 SV=2	3.583	0.02
ARI1_MOUSE E3 ubiquitin-protein ligase ARIH1 OS=Mus musculus GN=Arih1 PE=2 SV=3	3.533	0.02
ACY2_MOUSE Aspartoacylase OS=Mus musculus GN=Aspa PE=1 SV=2	3.413	0.03
HACD3_MOUSE 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3 OS=Mus musculus GN=ptplad1 PE=1 SV=2	3.400	0.03
PEPL_MOUSE Periplakin OS=Mus musculus GN=Ppl PE=1 SV=1	3.382	0.03
Q3U122_MOUSE Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN=Acta2 PE=2 SV=1	3.376	0.03
ACTN4_MOUSE Alpha-actinin-4 OS=Mus musculus GN=Actn4 PE=1 SV=1	3.272	0.04
FHL2_MOUSE Four and a half LIM domains protein 2 OS=Mus musculus GN=Fhl2 PE=1 SV=1	3.261	0.04
ARL1_MOUSE ADP-ribosylation factor-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Arl1 PE=2 SV=1	3.227	0.05
PTPA_MOUSE Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator OS=Mus musculus GN=Ppp2r4 PE=1 SV=1	-3.282	0.04
PRVA_MOUSE Parvalbumin alpha OS=Mus musculus GN=Pvalb PE=1 SV=3	-3.312	0.04
ANKS3_MOUSE Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Anks3 PE=2 SV=2	-3.501	0.02
PGTB2_MOUSE Geranylgeranyl transferase type-2 subunit beta OS=Mus musculus GN=Rabggtb PE=1 SV=2	-3.535	0.02
ENOG_MOUSE Gamma-enolase OS=Mus musculus GN=Eno2 PE=1 SV=2	-3.779	0.01
CAH3_MOUSE Carbonic anhydrase 3 OS=Mus musculus GN=Ca3 PE=1 SV=3	-4.198	0.00
PGM5_MOUSE Phosphoglucomutase-like protein 5 OS=Mus musculus GN=Pgm5 PE=1 SV=2	-4.495	0.00
KAP3_MOUSE cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit OS=Mus musculus GN=Prkar2b PE=1 SV=3	-5.060	0.00

¹Z_{qa}, log₂ ratio corregido y estandarizado a nivel de proteína, el color varía de -10 a 10 de rojo a verde. ²FDR_{qa}, tasa de valores que se desvían de la media cuantificación de proteína a super media, se muestran solo las proteínas con valores inferiores a 0,05.

Tabla Suplementaria 5. Listado completo de posibles interactores de RCAN1.4 en segmentos de aorta de ratón

Descripción del Fasta de la Proteína	Gen	Z_{qa}^1	FDR_{qa}^2
RCAN1_MOUSE Calciopressin-1	Rcan1	-6.44	0.00
FIBB_MOUSE Fibrinogen beta chain	Fgb	-6.36	0.00
CTGF_MOUSE Connective tissue growth factor	Ctgf	-6.23	0.00
MA2B1_MOUSE Lysosomal alpha-mannosidase	Man2b1	-4.80	0.00
CO3_MOUSE Complement C3	C3	-4.59	0.00
FLNC_MOUSE Filamin-C	Flnc	-4.58	0.00
GDIA_MOUSE Rab GDP dissociation inhibitor alph...	Gdi1	-4.44	0.00
CAD13_MOUSE Cadherin-13	Cdh13	-4.39	0.00
HEMO_MOUSE Hemopexin	Hpx	-4.31	0.00
AL1L1_MOUSE Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate...	Aldh1l1	-4.14	0.00
HPT_MOUSE Haptoglobin	Hp	-4.13	0.00
FIBA_MOUSE Fibrinogen alpha chain	Fga	-4.12	0.00
LTBP4_MOUSE Latent-transforming growth factor b...	Ltbp4	-4.06	0.01
PLIN1_MOUSE Perilipin-1	Plin1	-4.00	0.01
Q8BHN6_MOUSE Poly(ADP-ribose) polymerase 3	Parp3	-3.83	0.01
CO4B_MOUSE Complement C4-B	C4b	-3.76	0.01
ACADV_MOUSE Very long-chain specific acyl-CoA d...	Acadvl	-3.65	0.02
LAMA5_MOUSE Laminin subunit alpha-5	Lama5	-3.62	0.02
PAI1_MOUSE Plasminogen activator inhibitor 1	Serpine1	-3.55	0.02
SPA3N_MOUSE Serine protease inhibitor A3N	Serpina3n	-3.52	0.02
LOXL3_MOUSE Lysyl oxidase homolog 3	Loxl3	-3.49	0.02
ACO13_MOUSE Acyl-coenzyme A thioesterase 13	Acot13	-3.49	0.02
EIF3I_MOUSE Eukaryotic translation initiation f...	Eif3i	-3.46	0.02
GYS2_MOUSE Glycogen [starch] synthase, liver	Gys2	-3.46	0.02
ACSL1_MOUSE Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	Acsl1	-3.36	0.03
TSP1_MOUSE Thrombospondin-1	Thbs1	-3.27	0.04
PDK4_MOUSE [Pyruvate dehydrogenase (acetyl-tra...	Pdk4	-3.22	0.04
LIPS_MOUSE Hormone-sensitive lipase	Lipe	-3.20	0.05
PIGT_MOUSE GPI transamidase component PIG-T	Pigt	-3.19	0.05
F120A_MOUSE Constitutive coactivator of PPAR-ga...	FAM120A	3.23	0.04
ILF2_MOUSE Interleukin enhancer-binding factor...	Ilf2	3.28	0.04
F7CVJ5_MOUSE Protein Ahnak2	Ahnak2	3.33	0.03
CO6A1_MOUSE Collagen alpha-1(VI) chain	Col6a1	3.38	0.03
CARF_MOUSE CDKN2A-interacting protein	Cdkn2aip	3.48	0.02
F6TQW2_MOUSE Protein Ighg2c	Ighg2c	3.59	0.02
SPB7_MOUSE Serpin B7	Serpinb7	3.67	0.02
ENOB_MOUSE Beta-enolase	Eno3	3.75	0.01
LMNA_MOUSE Prelamin-A/C	Lmna	3.80	0.01
DCTN1_MOUSE Dynactin subunit 1	Dctn1	4.04	0.01
MYH11_MOUSE Myosin-11	Myh11	4.81	0.00
O88493_MOUSE Type VI collagen alpha 3 subunit	Col6a3	5.29	0.00

¹ Z_{qa} , log₂ ratio corregido y estandarizado a nivel de proteína, el color varía de -10 a 10 de rojo a verde. ² FDR_{qa} , tasa de valores que se desvían de la media cuantificación de proteína a super media, se muestran solo las proteínas con valores inferiores a 0,05.

